



Fonction et régulation du complexe acétyltransférase TIP60 au cours de la réponse aux dommages de l'ADN

Thèse

Karine Jacquet

Doctorat en biologie cellulaire et moléculaire
Philosophiae doctor (Ph.D.)

Québec, Canada

© Karine Jacquet, 2016

**Fonction et régulation du complexe
acétyltransférase Tip60 au cours de la réponse aux
dommages de l'ADN**

Thèse

Karine Jacquet

Sous la direction de :

Jacques Côté, directeur de recherche

Résumé

La chromatine protège et organise la molécule d'ADN dans le noyau. Sa dynamique est essentielle afin de réguler l'accès direct à l'information génétique encodée dans la séquence de l'ADN durant les processus de la réplication, la transcription et la réparation. Le complexe acétyltransférase TIP60/NuA4 est un régulateur clé de la stabilité et de l'expression du génome, fréquemment dérégulé dans certains cancers.

L'analyse de ce complexe multiprotéique a constitué le cœur de mes études doctorales. Mon projet portait sur l'étude de la fonction et de la régulation du complexe au cours de la réparation des dommages de l'ADN. Il s'est ainsi découpé en 3 axes: comprendre le recrutement du complexe TIP60 à la cassure double-brin, sa régulation durant la réparation et sa fonction exacte au cours de la réponse aux dommages. Mon objectif initial était de purifier le complexe TIP60 natif afin d'effectuer des analyses par spectrométrie de masse.

Dans un premier temps, nous avons développé une méthode alliant édition du génome et étude protéomique afin d'améliorer et de faciliter l'exploration des interactions protéiques au sein de complexes à sous-unités multiples comme TIP60. Elle rend possible l'étude des activités biochimiques et des liens structure-fonction. De plus, nous avons étudié les modifications post-traductionnelles du complexe comme l'acétylation et la phosphorylation. Finalement, j'ai cherché à clarifier la fonction du complexe durant la réparation via l'identification de nouveaux substrats d'acétylation.

Ainsi, nous avons identifié MBTD1 comme étant une nouvelle sous-unité stable du complexe, ce qui nous a permis de clarifier la fonction de TIP60. De façon intéressante, l'identification d'un nouveau substrat au sein de la chromatine a éclairci la fonction précoce de TIP60 lors du choix de voie de réparation. Finalement, une fonction plus tardive de TIP60 est suggérée par l'identification de nouveaux substrats non histone au sein de la voie de recombinaison homologue. L'ensemble de ces travaux a permis d'éclaircir la régulation et la fonction de TIP60 au cours de la réparation des cassures double-brin de l'ADN conduisant à une meilleure compréhension des mécanismes d'oncogenèse.

Table des matières

Résumé	III
Table des matières	IV
Listes des tableaux	VIII
Listes des figures	IX
Listes des figures supplémentaires.....	XI
Listes des abréviations.....	XII
Remerciements	XIX
Avant-propos	XX
1. Chapitre 1: Introduction.....	1
1.1 Structure et dynamique de la chromatine	2
1.1.1 Définitions et généralités sur la chromatine	2
1.1.2 Les facteurs impliqués dans la dynamique de la chromatine	5
1.1.3 Les complexes de remodelage de la chromatine ATP-dépendants	24
1.1.4 Les chaperons d'histones	26
1.2 Le complexe TIP60/NuA4: un acteur essentiel de la dynamique chromatinienne	29
1.2.1 Description et présentation des sous-unités du complexe.....	29
1.2.2 Les activités enzymatiques au sein du complexe.....	31
1.2.3 Les domaines de lecture de la chromatine	34
1.2.4 Les substrats du complexe TIP60	39
1.2.5 Les fonctions du complexe TIP60.....	41
1.2.6 Rôle pendant la transcription.....	41
1.2.7 Rôle pendant la réparation des CDBs.....	42
1.3 Les cassures double-brin de l'ADN et leur réparation	46
1.3.1 Généralités sur les dommages de l'ADN et les cassures double-brin.....	46
1.3.2 Les voies principales de réparation des cassures double-brin de l'ADN.....	47
1.3.3 Réparation des CDBs dans un contexte chromatinien.....	51
1.3.4 Restauration de la chromatine.....	60
1.4 But du projet de doctorat	61
2. Chapitre 2: A Scalable Genome-Editing-Based Approach for Mapping Multiprotein Complexes in Human Cells.....	63
Résumé	64
Abstract	65
2.1 Introduction	66
2.2 Results	67

2.2.1	Characterization of a Potent Tandem Affinity Tag.....	67
2.2.2	Tandem-Affinity Purification Following Nuclease-Driven Gene Addition to the <i>AAVS1</i> Genomic Safe Harbor Locus.....	69
2.2.3	Tandem-Affinity Purification of Native Multisubunit Protein Complexes following CRISPR/Cas9-Driven Tagging of Endogenous Genes.....	72
2.2.4	TALEN-Enabled Purification of the Endogenous Polycomb Repressive Complex 2	73
2.2.5	Interactions Between Endogenously Tagged Chromatin Modifying Complexes and Genomic DNA Regions	74
2.2.6	Purification of Endogenous DNA Repair Complexes.....	76
2.2.7	Towards High-Throughput Genome-Scale Purification of Native Endogenous Protein Complexes.....	78
2.3	Discussion	80
2.3.1	Uses and limitations of the <i>AAVS1</i> safe harbor ectopic expression system	80
2.3.2	Advantages and limitations of endogenous tagging	81
2.4	Acknowledgments	83
2.5	Experimental procedures.....	83
2.5.1	Cell culture and transfection	83
2.5.2	ZFN, TALEN, and CRISPR/Cas9 reagents.....	83
2.5.3	Construction of plasmid donors for recombination.....	84
2.5.4	Targeted integration to the <i>AAVS1</i> locus.....	84
2.5.5	CRISPR/Cas9 and TALEN-driven targeted integration.....	84
2.5.6	Tandem affinity purification (Guruharsha et al.)	84
2.5.7	HAT and HMT assay.....	85
2.6	Supplemental information	85
3.	Chapitre 3: The TIP60 complex regulates bivalent chromatin recognition by 53BP1 through direct H4K20me binding and H2AK15 acetylation	86
	Résumé.....	86
	Abstract	88
3.1	Introduction	89
3.2	Experimental procedures.....	90
3.2.1	Establishment of isogenic cell lines expressing TIP60 components from the <i>AAVS1</i> safe harbor and MBTD1 KO cell lines using CRISPR/Cas9.....	90
3.2.2	Purification of native HAT complexes	91
3.2.3	ChIP and ChIP-seq libraries	91
3.2.4	<i>In vitro</i> and <i>in vivo</i> functional assays.....	91
3.3	Results	91
3.3.1	MBTD1 is a new stable subunit of the human TIP60 complex.....	91
3.3.2	MBTD1 regulates binding of the TIP60 complex to specific genes <i>in vivo</i>	93
3.3.3	MBTD1 is a regulator of DNA damage response within the TIP60 complex.....	96
3.3.4	Tip60 and MBTD1 regulate the dynamics of 53BP1 binding near DNA damage	99

3.3.5	A switch between ubiquitylation and acetylation of H2AK15 can regulate the opposing functions of 53BP1 and TIP60	103
3.4	Discussion	107
3.5	Acknowledgments	110
3.6	Supplemental experimental procedures	111
3.6.1	Establishment of isogenic cell lines expressing TIP60 components from the <i>AAVS1</i> safe harbor.....	111
3.6.2	Purification of native HAT complexes	111
3.6.3	Mass spectrometry analysis	111
3.6.4	CRISPR/Cas9-mediated KO of MBTD1 in U2OS cells and microarray analysis.....	112
3.6.5	Antibodies and RNA interference	113
3.6.6	ChIP-seq experiments and analysis.....	114
3.6.7	ChIP at DSB.....	114
3.6.8	<i>In vitro</i> histone acetylation assay.....	115
3.6.9	Recombinant MBTD1, 53BP1 and EPC1 purifications and pull-downs	116
3.6.10	Immunofluorescence	116
3.6.11	HR / NHEJ assays and cell cycle analysis	117
3.6.12	Chromatin extract and histone acid extraction	118
3.6.13	<i>In vitro</i> histone acetylation and ubiquitylation assays.....	118
3.6.14	COMET assay.....	118
3.6.15	Colony formation assays	119
3.7	Supplemental figures and tables	120
4.	Chapitre 4 : Lien entre l'acétylation du chromodomaine de Tip60/KAT5 et la réponse aux dommages de l'ADN.....	132
	Avant-propos	133
4.1	Introduction	134
4.2	Résultats	134
4.2.1	Dynamique de phosphorylation et de déacétylation du complexe TIP60 en réponse à des dommages sur l'ADN.....	134
4.2.2	L'acétylation du chromodomaine sur le résidu K52 affecte l'activité du complexe <i>in vitro</i>	136
4.2.3	L'acétylation de K52 impacte la reconnaissance de la chromatine	138
4.2.4	L'acétylation de K52 joue un rôle pendant la réponse aux dommages de l'ADN	141
4.2.5	Chez la levure, l'acétylation de K61 joue un rôle important dans la survie	143
4.3	Conclusion.....	145
5.	Chapitre 5 : Discussion - Conclusion	152
5.1	MBTD1 : une nouvelle sous-unité du complexe TIP60	153
5.2	La grande diversité de composition du complexe TIP60 et de ses sous-complexes	155
5.3	Recrutement du complexe pendant la réparation.....	157
5.4	Régulation du complexe via des modifications post-traductionnelles.....	159

5.5	Fonction du complexe durant la réparation des CDB.....	161
5.6	Autres fonctions de TIP60	163
5.7	Conclusion:.....	165
	Références	167
	Appendices	195
	Avant-propos	196

Listes des tableaux

Tableau 1.1: Les principales familles de lysines acétyltransférases (KAT) chez l'humain

Tableau 1.2: Principales modifications post-traductionnelles des histones et exemples de domaines de lecture

Tableau 1.3: Complexes de remodelage de la chromatine chez l'humain

Tableau 1.4: Chaperons d'histones, spécificité et fonctions chez l'humain

Tableau 1.5: Présentation du complexe TIP60

Listes des figures

Figure 1.1: Structure et composition d'un nucléosome

Figure 1.2: Organisation de la fibre chromatinienne de 2 à 1400 nm

Figure 1.3: Les histones cœur et leur variants

Figure 1.4: Principales modifications post-traductionnelles des histones

Figure 1.5: La réaction d'acétylation

Figure 1.6: Les complexes NuA4 et TIP60

Figure 1.7: Résidus acétylés par TIP60 au sein de la chromatine *in vivo*

Figure 1.8: Connections entre TIP60 et l'oncogénèse

Figure 1.9: Représentation schématique simplifiée des voies de réparation par NHEJ canonique ou alternative

Figure 1.10: Représentation schématique simplifiée de la voie de recombinaison homologue

Figure 1.11: Influence de la structure de la chromatine préexistante sur la DDR

Figure 1.12: Détection d'une cassure double-brin dans un contexte de chromatine

Figure 2.1. ZFN-Driven Gene Addition to the *AAVS1* Locus Simplifies Tandem-Affinity Purification of Multisubunit Protein Complexes

Figure 2.2. CRISPR/Cas9-Driven Tagging of NuA4 Subunits Enables Reciprocal Tandem-Affinity Purification of the Endogenous Native Complexes

Figure 2.3. Tandem-Affinity Purification of the Native PRC2 Protein Complex

Figure 2.4. Tandem-Affinity Purification of Endogenously Tagged Fanconi Anemia Core Complex

Figure 2.5. Tandem-Affinity Purification of Endogenously Tagged Minichromosome Maintenance Complex Component 8

Figure 2.6. Efficient Complex Purification from Unselected Gene-Modified Cell Pools

Figure 3.1: MBTD1 is a stable subunit of the human TIP60/NuA4 acetyltransferase complex

Figure 3.2: MBTD1 binds the H4K20me1/2 histone mark and colocalizes with the TIP60 complex at gene regulatory elements in the genome

Figure 3.3: MBTD1 is implicated with TIP60 in the repair of DNA double strand breaks by homologous recombination

Figure 3.4: MBTD1 can displace 53BP1 from the H4K20me2 histone mark and affects the dynamics of 53BP1 foci after DNA damage

Figure 3.5: MBTD1 knockout cells show DNA repair deficiency and increased formation of 53BP1 foci after DNA damage

Figure 3.6: H2AK15 ubiquitylation by RNF168 versus acetylation by the TIP60 complex

Figure 3.7: Acetylation of H2AK15 by TIP60 is linked to breaks preferentially repaired by HR during S/G2

Figure 4.1: Dynamique d'acétylation et de phosphorylation du complexe TIP60 en réponse à des dommages de l'ADN.

Figure 4.2: L'acétylation de Tip60 sur la lysine 52 au sein du chromodomaine affecte l'activité de TIP60.

Figure 4.3: L'acétylation au sein du domaine chromobarrel (CBD) de Tip60 et Esa1 affecte l'interaction avec la chromatine *in vitro*.

Figure 4.4: L'acétylation au sein du chromodomaine de Tip60 affecte potentiellement la localisation du complexe au sein du génome.

Figure 4.5: L'acétylation au sein du chromodomaine de Tip60 affecte la réponse aux dommages de l'ADN.

Figure 4.6: L'acétylation au sein du chromodomaine d'Esa1 affecte la survie chez la levure.

Figure 4.7: Modèle du rôle de l'acétylation de K52 au cours de la réponse aux dommages

Figure 5.1: Modèle final

Listes des figures supplémentaires

Figure 3.S1: Identification and role of MBTD1 within the TIP60 complex

Figure 3.S2: Influence of MBTD1 in TIP60 interactions with chromatin *in vitro* and *in vivo*

Figure 3.S3: MBTD1 is detected at DSB and affects the dynamics of -H2AX foci after DNA damage

Figure 3.S4: MBTD1 affects the dynamics of 53BP1 foci after DNA damage

Figure 3.S5: Validation and analysis of MBTD1 KO cell lines produced by CRISPR/Cas9

Figure 3.S6: Interrelation between TIP60 and H2AK15 modifications

Figure 3.S7: Acetylation of H2AK15 by the TIP60 complex during the DDR

Figure 4.S1: Analyse de la phosphorylation du complexe TIP60 par spectrométrie de masse

Figure 4.S2: Analyse de l'acétylation du complexe TIP60 par spectrométrie de masse

Table 3.S1: MBTD1 co-purifies with the native TIP60 acetyltransferase complex

Table 3.S2: MBTD1 is exclusively associated with the TIP60 complex

Table 3.S3: High confidence binding sites of the TIP60 complex in the genome of K562 cells

Table 3.S4: Microarray/expression analysis of MBTD1 KO in U2OS cells

Table 3.S5: Microarray/expression analysis of MBTD1 KO in U2OS cells

Table 3.S6: Microarray/expression analysis of MBTD1 KO in U2OS cells

Table 3.S7: Microarray/expression analysis of MBTD1 KO in U2OS cells

Listes des abréviations

AAA+: ATPase Associated with various cellular functions
Act1: actin 1
ACF: ATP-dependent chromatin assembly and remodeling factor
ADN: acide désoxyribonucléique
ANP32E: acidic leucine-rich nuclear phosphoprotein 32 family member E
APRIN: Androgen-induced proliferation inhibitor
ARN: acide ribonucléique
ARP: actin related protein
Asf1: Anti-silencing function protein 1
ATAC: ADA-two-A-containing
ATM: ataxia telangiectasia mutated
ATR: ataxia telangiectasia and Rad3 related
ATRX: Alpha Thalassemia/Mental Retardation Syndrome X-Linked
ATP: adenosine triphosphate
BAF: BRG1 associated factors
BAH: bromo adjacent homology
BAP1: BRCA1 associated protein 1
Bdf1: bromodomain factor 1
BER: base excision repair
BIR: break induced replication
BLM: Bloom syndrome protein
BRCA1 & 2: breast cancer 1 & 2
BRCT: BRCA1 C terminus
BRD: bromodomain
BRG1: brahma related gene 1
BRK: BRM & KIS domain
BRM: brahma
BRPF: Bromodomain & PHD finger-containing protein
CAF1: chromatin assembly factor 1
CATD: CENP-A targeting domain
CBP: CREB binding protein
CBD: chromobarrel domain
CDB: cassure double-brin
CENP-A: centromeric protein A
ChAM: chromatin association motif
CHD: chromodomain
CHD1: chromodomain helicase DNA binding 1
CHRAC: chromatin accessibility complex
Chz1: chaperone of H2AZ-H2B
ChIP: chromatin immunoprécipitation

CK2: casein kinase 2
Crb2: cut5-repeat-binding protein 2
cryo-EM: cryo-electron microscopy
CSR: class switch recombination
DDR: DNA damage response
diRNA: double strand break induced RNA
DivA-AID: DSB inducible via AsiSI-ER and auxin inducible degron
DMP1: DNA methyltransferase 1-associated protein 1
Dna2: DNA replication ATP-dependent helicase/nuclease 2
DNA-PK: protein kinase DNA dependant
DNA-PKcs: DNA-PK catalytic subunit
DOT1: disruptor of telomeric silencing 1
DPF: double PHD finger
DUB: deubiquitylase
Eaf: esa1 associated factor
Epl1: enhancer of polycomb like 1
ENCODE: encyclopedia of DNA elements
Esa1: essential SAS2-related acetyltransferase 1
EXO1: exonuclease 1
EZH: Enhancer of zeste
FA: Fanconi Anemia
FAD: flavin adenine dinucleotide
FACT: facilitates chromatin transcription
FANC: Fanconi Anemia factor
FAT: focal adhesion targeting
FATC: FAT C-terminal
FFR: focus forming region
FHA: forkhead associated domain
FRB: FKBP12 rapamycin binding
GAS41: glioma amplified sequence 41
Gcn5: general control nonderepressible 5
GNAT: Gcn5 N acetyltransferase related
GREAT: genomic region enrichment of annotation tool
HA: human influenza hemagglutinin
HAT: histone acetyltransferase
HBO1: histone acetyltransferase Bound to ORC1
HIRA: histone chaperon histone regulator A
HEAT: Huntingtin, elongation factor 3, PR65/A, and TOR
HECT: Homologous to the E6AP Carboxyl terminus
HELB: DNA helicase B
HIRA: histone cell cycle regulation defective homolog A
HJURP: Holliday junction recognition protein

HMT: histone methyltransferase
Htz1: yeast H2AZ 1
HP1: heterochromatin protein 1
HPV: human papillomavirus
HR: homologous recombination
HSA: helicase SANT associated
HU: hydroxyurea
ICL: interstrand crosslink
ING: inhibitor of growth
Ino80: inositol requiring 80
IRIF: irradiation induced foci
ISWI: imitation SWI/SNF
JAMM: JAMM/MPN domain-associated metallopeptidases
Jmj: Jumonji
KAP1: KRAB-associated protein 1
KDAC: lysine deacetylase
KEAP1: Kelch-like ECH-associated protein 1
KMT: lysine methyltransferase
LANA: latency-associated nuclear antigen
L3MBTL: Lethal(3)malignant brain tumor-like protein
LEDGF: lens epithelium-derived growth factor
LSD: lysine specific demethylase
MBP: maltose binding protein
MBT: Malignant Brain Tumor
Mcm: minichromosome maintenance
MCPIP: monocyte chemotactic protein-induced protein
MDa: mega dalton
MDC1: mediator of DNA damage checkpoint 1
MDM2: murin double minute 2
MEF: mouse embryonic fibroblast
miRNA: microRNA
MJD: Machado Joseph disease protein domain proteases
MMEJ: microhomology mediated end joining
MMR: mismatch repair
MMS: methyl methane sulfonate
MMSET: Multiple myeloma SET domain-containing protein
MOF: male absent on the first
MORF: Monocytic leukemia zinc finger protein-related factor
MORF4: mortality factor 4
MOZ: monocytic leukemia zinc finger
MRG15/X: MORF related gene on chromosome 15/X
MRN: Mre11, RAD50, NBS1

MS: mass spectrometry
MSL: male specific lethal
MIU: Motif Interacting with Ubiquitin
MYST: MOZ, Ybf2/Sas3, Sas2, TIP60
NAD: nicotinamide adenine dinucleotide
NAP1: nucleosome assembly protein 1
ncRNA: non coding RNA
NEDD8: neural precursor cell expressed developmentally downregulated protein 8
NER: nucleotide excision repair
NFR: nucleosome free region
NHEJ: Non homologous end joining
NLS: nuclear localization signal
NoRC: nucleolar remodeling complex
NIPBL: Nipped-B like protein
NuA4: nucleosome acetyltransferase of H4
NuRD: Nucleosome Remodeling Deacetylase
NURF: Nucleosome Remodeling Factor
ORF: open reading frame
OTU: ovarian tumor protease
PADI: peptidyl-arginine deiminase
PALB2: partner and localiser of BRCA2
PAR: poly-ADP ribose
PARP: PAR-polymerase
PARG: PAR-glycohydrolase
PAXX: paralog of XRCC4 and XLF
pb/bp: paire de base/base pair
PBAF: polybromo-associated BAF
PCAF: p300/CBP associated factor
PCNA: proliferating cell nuclear antigen
PH: pleckstrin homology
PHD: plant homeodomain
PHF: PHD finger protein
PI3K: phosphatidylinositol 3 kinase
PIKK: PI3K related kinases
PIP: phosphatidyl inositol bi/tri phosphate
PLIP: cPLA2-interacting protein
Pol II: ARN polymerase II
PRC: Polycomb Repressive Complex
PRMT: proteine arginine methyltransferase
PTIP: Pax interacting protein
PTM: post-traductional modification
Rad: radiation

RAG: recombination activating protein
RBR: RING Between RING
RecA: recombinase A
RIF1: Rap1 interacting factor 1
RING: Really Interesting New Gene
RNF: RING finger protein
RPA: replication protein A
Rpd3: reduced potassium dependency 3
RSF: remodeling and spacing factor
Rtt109: regulation of Ty1 transposition 109
ROS: reactive oxygen species
SAGA: Spt, Ada, Gcn5 et acetyltransferase
SAM: S-adenosylmethionine
SANT: Swi3, Ada2, N-Cor et TFIIIB
Sas: something about silencing
SC: synthetic complete
SDSA: synthesis dependant strand annealing
SENP: Sentrin/SUMO-specific protease
SET: Suppressor of variegation, enhancer of zeste, trithorax
Sfmbt: Smc-related gene containing four MBT domains
SILAC: Stable isotope labeling by amino acids in cell culture
SIM: SUMO Interacting Motif
Sin3: Swi-independent 3
Sir: silent information regulator protein
SLIDE: SANT-like ISWI domain
SMC: structural maintenance of chromosome
SNF: sucrose non fermentation
SRCAP: Snf2-related CREB-activator protein
STAGA: SPT3-TAF_{II}31-GCN5 acetyltransferase
STK4: Serine/threonine protein kinase 4
SUMO: Small Ubiquitin-like Modifier
Swc: Swr complex
SWI: mating type switching
SWR1: Swi2/Snf2-related ATPase 1
TAF: TBP associated factor
TAP: tandem affinity purification
TBP: TATA box binding protein
TEV: tobacco etch virus
TFIID: transcription factor II D
TFTC: TBP-free TAF complex
TINTIN: trimer independent on NuA4 involved in transcription interactions with nucleosomes
TIP60: Tat interacting protein 60kDa

TLS: translesion synthesis
TOR: target of rapamycin
Tra1: yeast homolog of TRRAP1
TRRAP: transformation/transactivation domain associated protein
TRP: tetratricopeptide
TSS: transcription start site
TSA: trichostatin A
TTD: tandem tudor domain
UBA: ubiquitin associated
UBC: ubiquitin conjugating domain
UBD: ubiquitin binding domain
UBL: Ubiquitin Like
UBM: ubiquitin binding motif
UBZ: ubiquitin binding zinc finger
UCH: ubiquitin C-terminal hydrolase
UDR : ubiquitination-dependent recruitment
UEV: ubiquitin conjugating enzyme variant
UIM: ubiquitin interacting motif
UMI: UIM- and M/U-related UBD
USP: ubiquitin specific protease
UTR: untranslated region
VCP: Valosin containing protein
V(D)J: variable, diversity and joining genes
Vps: vacuolar protein sorting
WT: wild type
WICH: WSTF-ISWI chromatin remodeling complex
XLF: XRCC4 like factor
XRCC4: X-ray repair cross-complementing protein 4
Yaf9: yeast AF-9
YEATS: Ynl107, ENL, AF9, and TFIIIF small subunit
Yng: yeast homolog of mammalian ING1
YPD: yeast extract peptone dextrose
YY1: Yin and Yang protein 1
ZEB: zinc finger E-box binding homeobox
53BP1: Tp53 binding protein 1

À mes parents

Remerciements

J'aimerais tout d'abord remercier le Dr Jacques Côté de m'avoir offert l'opportunité de réaliser mon doctorat dans son laboratoire. Je suis reconnaissante de l'autonomie et de la liberté que tu m'as laissée pendant ces années. Merci de m'avoir transmis ta curiosité et ta rigueur scientifique. J'ai beaucoup apprécié que tu prennes le temps de discuter et de toujours répondre avec enthousiasme à mes questions. Merci pour ta confiance, ton support et tes encouragements dans les moments difficiles.

Merci aux membres passés et présents du laboratoire avec qui j'ai eu le plaisir de travailler. Merci à Nikita, Marie-Eve, Rhea, Valérie, Céline et Pauline pour votre soutien technique. Merci à Dorine, Anne-Lise et Xue d'avoir toujours été disponibles pour parler de Science.

Merci également aux chercheurs et étudiants que j'ai pu côtoyer, au sein du centre de recherche et en dehors. Plus généralement, merci à toutes les personnes qui ont contribué à la réussite de mon doctorat.

Bien sur, un très grand merci à mes proches, ma famille, mes amis de France et du Québec pour leur soutien inconditionnel sans qui rien n'aurait été possible. Merci pour votre support, votre patience et votre compréhension.

J'aimerais finalement remercier les membres du jury, les Drs Jean-Yves Masson, El Bachir Affar et Steve Bilodeau d'avoir accepté d'évaluer ma thèse de doctorat.

Avant-propos

Au cours de mes études doctorales, j'ai travaillé sur différents projets en rapport avec la régulation chromatinienne qui ont donné lieu à 4 publications dont les 2 principales sont présentées en chapitres 2 et 3. Les résultats présentés en chapitre 4 font partie d'un manuscrit en préparation. Un dernier article publié dans la revue scientifique *Molecular Cell* (Mol Cell. 2016 Jan 7;61(1):27-38) dépasse le cadre de cette thèse et ne sera pas présenté.

L'article présenté en chapitre 2 a été publié dans la revue scientifique *Cell Report* (Cell Rep. 2015 Oct 20;13(3):621-33). Cet article, sur lequel je suis deuxième auteur, porte sur la présentation de méthodes d'édition du génome et de purification de complexes natifs. J'ai effectué des tests préliminaires relatifs au protocole de purification. J'ai participé à la réalisation des expériences des figures 1(B, D, E), 2(H, I, J, K), 3(D, G, H) en collaboration avec Mathieu Dalvai. Les lignées utilisées pour ces expériences ont été construites par Mathieu Dalvai, Pauline Herst et Yannick Doyon. Les autres expériences ont été réalisées par Jeremy Loehr, Mathieu Dalvai, Céline Roques, Caroline Huard et Yannick Doyon. L'ensemble de ces données a été collecté a posteriori des travaux du chapitre 3 qui utilise la première version du système.

L'article présenté dans le chapitre 3 a été accepté pour publication dans la revue scientifique *Molecular Cell* au moment du dépôt de cette thèse. En tant que première auteure, j'ai participé à l'écriture du manuscrit ainsi qu'à la réalisation des figures. De plus, j'ai réalisé les expériences des figures 1, 2, 6, 7, S1, S2, S3, S5 et S7 au complet ainsi que les figures 3(A), 4(A) et S6. Amélie Fradet-Turcotte a réalisé les expériences des figures 4(B, C, D, E), 5(B, C, D, E, F) et S4 et S6(A) sous la direction de Daniel Durocher. Les analyses par spectrométrie de masse ont été réalisées par Jean-Philippe Lambert sous la direction d'Anne-Claude Gingras. Céline Roques a réalisé les expériences des figures 3(C, D, E), 5(A) et S3(E). Pauline Herst a produit les lignées cellulaires KO MBTD1. Raj Pandita a réalisé les expériences des figures 3(B) et S3(C, D) sous la direction de Tej Pandita. Eric Paquet a effectué les analyses bio-informatiques nécessaires pour les figures 2 et S2 ainsi que les tableaux supplémentaires 3 à 7. Nikita Avvakumov a participé à l'édition du manuscrit et a effectué des expériences préliminaires. Gaëlle Legube a participé à la construction des lignées DiVA et a réalisé la figure S3(B). Finalement, Yannick Doyon a construit les lignées cellulaires qui ont initié ce projet et a réalisé des expériences préliminaires importantes à l'identification de MBTD1.

Concernant les résultats présentés dans le chapitre 4, j'ai réalisé l'ensemble des expériences à l'exception de la figure 6(A) qui a été réalisée par Dorine Rossetto. Les analyses par spectrométrie de masse ont été effectuées par Jean-Philippe Lambert dans le laboratoire d'Anne-Claude Gingras. L'analyse bio-informatique a été effectuée par Eric Paquet. Toutes les souches de levure ont été construites par Dorine Rossetto.

J'ai réalisé les expériences présentées dans les appendices 1 à 7. Les analyses par spectrométrie de masse ont été réalisées par Jean-Philippe Lambert sous la direction d'Anne-Claude Gingras. Yannick Doyon a construit la lignée exprimant la fusion oncogénique. Eric Paquet a effectué les analyses bio-informatiques pour l'appendice 7. Rémi Buisson a purifié les substrats de l'appendice 5. Les analyses par spectrométrie de masse ont été réalisées à la plateforme TAPLIN pour l'appendice 6. L'appendice 8 correspond à un manuscrit, soumis à la revue scientifique *Journal of biological chemistry* et pour lequel j'ai participé à la réalisation des figures 1(D), 5 (A,B,C).

1. Chapitre 1: Introduction

L'étude des mécanismes de maintien de la stabilité du génome dans un contexte de chromatine est une problématique centrale de recherche en oncologie. L'interrelation entre les régulateurs de la chromatine et les différentes machineries de réparation de l'ADN fait partie des centres d'intérêt de mon laboratoire. Plus spécifiquement, le complexe acétyltransférase TIP60 se trouve au cœur de la dynamique chromatinienne et son implication au cours de la réparation des cassures double-brin de l'ADN (CDB) est essentielle. *Cette problématique m'a intéressée au cours de mes études de doctorat et va être introduite dans le chapitre 1.*

1.1 Structure et dynamique de la chromatine

1.1.1 Définitions et généralités sur la chromatine

L'ADN est le support de l'information génétique empaqueté dans le noyau de la cellule eucaryote sous forme de chromatine. C'est une structure hautement organisée définie par la molécule d'ADN et l'ensemble des protéines qui lui est associé. Premièrement, l'ADN va s'associer à de petites protéines appelées histones pour former une structure répétée de la chromatine qui est le nucléosome. Ces nucléosomes vont s'organiser de façon dynamique dans l'espace et dans le temps et ainsi réguler l'accès au génome. Au delà des histones, d'autres facteurs vont s'associer aux nucléosomes pour former un niveau supplémentaire de compaction. La notion d'épigénétique est reliée à l'étude de la chromatine. Au delà de la séquence nucléotidique de l'ADN, il existe une information qui vient réguler l'expression des gènes, qui repose sur la structure et la dynamique de la chromatine et qui est potentiellement transmissible à la cellule fille.

1.1.1.1 Les histones

Les histones sont les protéines les plus conservées au cours de l'évolution. Outre l'absence de noyau, les procaryotes possèdent des protéines dites « histones-like » qui sont les ancêtres fonctionnels des histones. Les histones sont des protéines de faible taille (de 11 à 16 kDa), centralement globulaires formées de 3 hélices- α (structure appelée "histone-fold", figure 1.1A) et non structurée au niveau des extrémités ou queues. Les histones sont riches en acides aminés basiques lysines et arginines. Leur forte charge positive favorise ainsi leur interaction avec les phosphates négatifs de l'ADN. Elles sont partagées en 5 classes: H4, H3, H2A, H2B et H1/H5. Les histones sont très abondantes au sein de la cellule et sont produites en grande quantité en phase S dans le cytoplasme pour être ensuite transloquées au noyau et

incorporées lors de la réplication de l'ADN. Les gènes codant pour les histones sont présents en multiples copies (d'une à plusieurs dizaines) au sein de 3 clusters présents sur différents chromosomes chez l'humain. De plus, leur transcription est particulière puisque les histones canoniques ne contiennent pas d'intron et pas de signal de poly-adénylation. Ceci a pour fonction de garantir une expression régulée d'ARNm, pour répondre adéquatement aux besoins de la cellule (Doenecke et Albig, 2005).

1.1.1.2 Structure de la chromatine

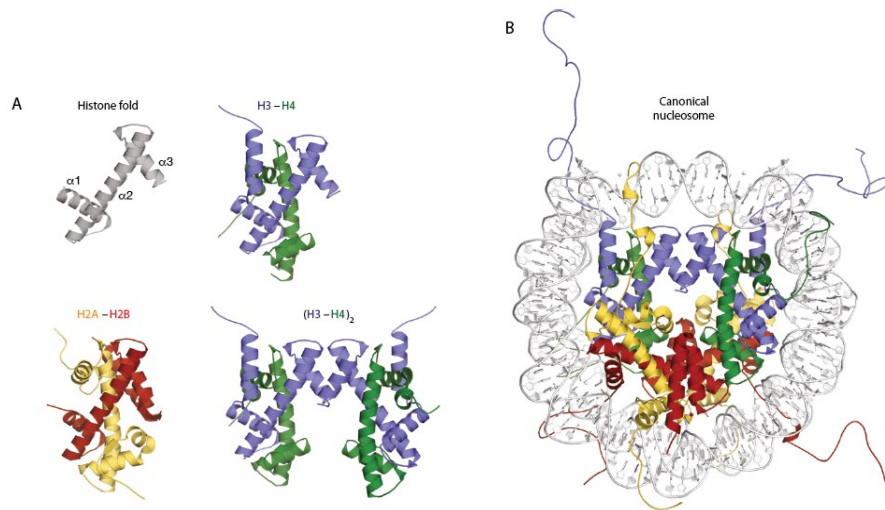


Figure 1.1: Structure et composition d'un nucléosome (adapté de (Mattioli et al., 2015)). (A) Structure "histone fold", dimères H2A-H2B, H3-H4 et tétramère d'histones (*Xenopus laevis*) (B) Structure d'un nucléosome cœur. Les queues des histones sont exposées vers l'extérieur de la structure du nucléosome. H1 n'est pas représentée dans cette structure.

Les histones vont s'associer à 147 paires de bases (bp) d'ADN pour former l'unité de base de la chromatine: le nucléosome (figure 1.1B). Chaque nucléosome contient 2 copies de chacun des histones de cœur soit un tétramère d'histones H3 et H4 auquel s'associe 2 dimères plus labiles d'histones H2A-H2B. L'histone de liaison H1 vient ensuite fermer la boucle d'ADN pour stabiliser le chromatosome. H1 permet de former des structures de plus haute compaction et d'organisation plus complexe.

Les multiples interactions de charge entre les histones et l'ADN négatif en font une structure stable et résistante à de hautes concentrations salines. Les extrémités N et C-terminales des histones ne sont pas structurées et sont exposées vers l'extérieur du nucléosome. Elles permettent des interactions inter-nucléosomales et sont aussi la cible de nombreux facteurs de régulation de la chromatine. Elles vont ainsi servir de site de recrutement ou de liaison, pour des facteurs de transcription par exemple et peuvent être le substrat de modifications post-traductionnelles abondantes et complexes (voir figure 1.4).

La fibre chromatinienne présente différents niveaux de compaction jusqu'au chromosome métaphasique (figure 1.2). Celui-ci représente le niveau de compaction maximal de la chromatine et garantit la séparation adéquate du matériel génétique lors de la division cellulaire. Cependant, la structure de la chromatine est plus complexe et subtile à l'échelle moléculaire.

1.1.1.3 Les fonctions de la chromatine

La chromatine forme différents types de domaines fonctionnels. L'euchromatine correspond à la chromatine ouverte et théoriquement activement transcrite, à l'opposé de l'hétérochromatine qui représenterait la chromatine mise sous silence et moins accessible. Cette différence structurale est visible dans le noyau de la cellule en interphase par microscopie et simple coloration du noyau. L'hétérochromatine représente généralement la plus grande proportion du génome et renferme des régions silencieuses ou non transcrites, des régions répétées et des séquences régulatrices du génome, qui sont répliquées plus tardivement (Soria et al., 2012). Il existe également d'autres domaines chromatinien essentiels à l'architecture des chromosomes comme les centromères et les télomères. De plus, la notion émergente d'architecture chromatinienne semble suggérer que le génome est minutieusement arrangé en 3D dans l'espace du noyau pour former des territoires chromosomiques régulant l'expression des gènes.

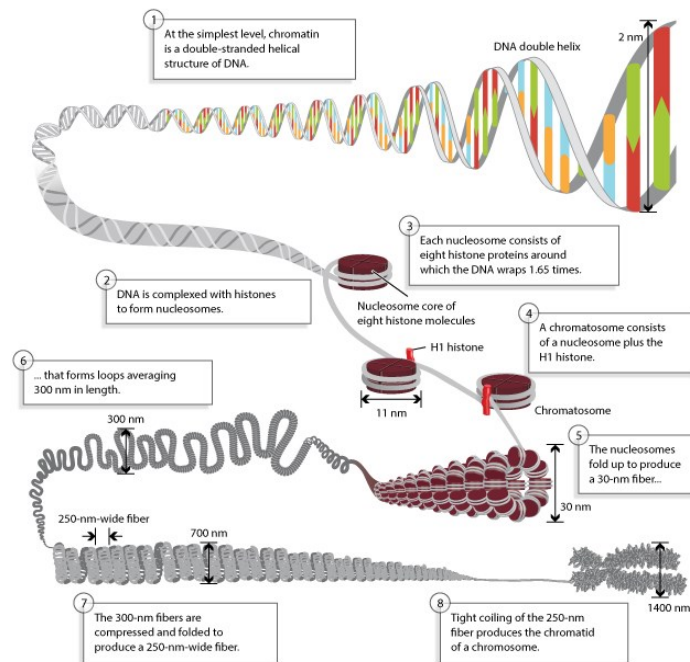


Figure 1.2: Organisation de la fibre chromatinienne de 2 à 1400 nm. L'enroulement de l'ADN nu sur l'octamère d'histones forme le nucléosome ou la particule cœur nucléosomale. L'histone de liaison H1

vient se lier pour former le chromatosome. Ceci va permettre l'enroulement des nucleosomes successifs, ou collier de perles, sur eux même pour former la fibre de 30nm. Elle-même va s'organiser en structures plus complexes jusqu'à la fibre de 250nm du chromosome métaphasique (1400nm environ). (Adapté de Annunziato, A. Nature Education 2008; 1(1):26).

Outre la compaction et l'organisation de la longue molécule d'ADN dans le noyau, la chromatine représente également une barrière physique. En effet, elle protège et régule l'accès direct à l'information génétique encodée dans la molécule d'ADN. L'ensemble des processus moléculaires qui nécessite la lecture ou l'accès direct comme la transcription, la réplication ou la réparation de l'ADN va donc induire le remodelage adéquat de la chromatine de manière dynamique. Par conséquent, les modifications de la structure de la chromatine doivent être finement régulées. La dynamique de la chromatine est sous le contrôle de différents facteurs: 1) l'incorporation de variants d'histones, 2) les modifications post-traductionnelles des histones, 3) les complexes de remodelage de la chromatine ATP-dépendants et 4) les chaperons d'histones (Steunou et al., 2014). *Chacun de ces éléments doit être présenté afin de mieux comprendre la fonction du complexe TIP60 qui sera décrit par la suite.*

1.1.2 Les facteurs impliqués dans la dynamique de la chromatine

1.1.2.1 *Incorporation de variants d'histones*

Les variants d'histones sont des paralogues des histones conventionnelles, par définition issus de duplication de gènes au cours de l'évolution (Talbert et al., 2012). Les gènes des variants sont localisés spécifiquement dans le génome (Hentschel and Birnstiel, 1981). Ils sont isolés et leur régulation transcriptionnelle est différente des histones canoniques. Leur gène possède une portion 3' non codante, une séquence de poly-adénylation et peuvent contenir des introns d'où la présence d'isoformes d'épissage. De plus, leur transcription n'est pas restreinte à la phase S du cycle cellulaire.

Les variants d'histones diffèrent plus ou moins des histones canoniques et représentent une faible proportion des histones dépendamment du tissu ou de l'espèce par exemple. Ils présentent le plus souvent des substitutions de quelques acides aminés ou des insertions de domaines additionnels (figure 1.3). Il existe des variants d'histones pour H2A, H3 et H1 et leur nombre est variable selon les espèces. Il est intéressant de noter qu'il n'existe pas de variants d'H4 chez l'humain.

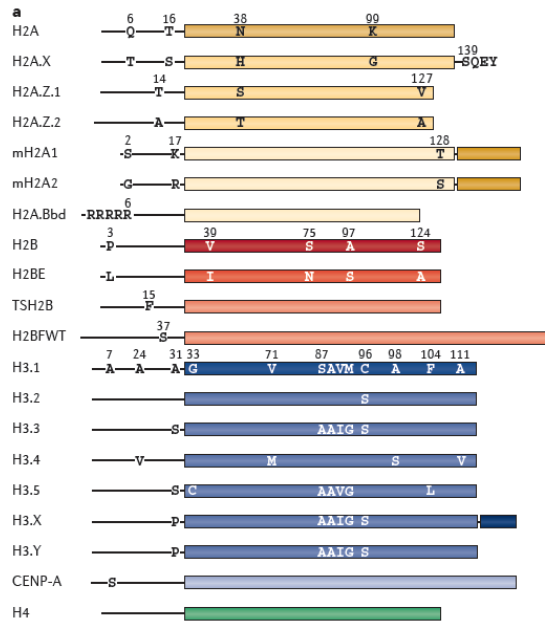


Figure 1.3: Les histones cœur et leur variants. Les différences de séquence, substitution ou insertion de domaines sont indiquées schématiquement pour les histones H2A (en beige), H2B (en rouge), H3 (en bleu) et H4 (en vert ; adapté de (Maze et al., 2014). Le macrodomaine de macroH2A représente une extension de 25kDa. De plus, H2AZ présente aussi une extension courte de sa queue N-terminale.

Les variants jouent des rôles importants sur la structure de la chromatine, la stabilité des nucléosomes (H2AZ) ou sur le recrutement de facteurs spécifiques (H2AX; H3.3), par exemple au cours du développement, chez le zygote, les cellules germinales mais aussi les cellules somatiques. De part leur impact structural, il semblerait que les nucléosomes soient toujours homogènes en terme de composition de variants ou homotypiques pour H3 et H4 mais possiblement hétérotypiques pour H2A-H2B. Des mutations au sein des variants d'histones sont impliquées dans certaines pathologies chez l'humain (Maze et al., 2014).

La dynamique des variants d'histones est sous le contrôle de chaperons et de complexes de remodelage de la chromatine (voir 1.1.3 et 1.1.4) (Soria et al., 2012; Talbert and Henikoff, 2010). Nous allons nous concentrer sur les variants principaux de H2A et H3. Leur fonction spécifique dans le maintien de la stabilité du génome sera décrite en partie 3.

1.1.2.1.a Les variants d'H2A

L'histone H2A possède le plus grand nombre de variants. H2A et H2B ont la particularité de former un domaine chargé négativement ou acide qui joue un rôle structural important au sein de la chromatine.

Ce domaine correspond à une courte séquence d'acides aminés acides donc chargée qui va régir les interactions inter-nucléosomales à travers la liaison de la queue N-terminale d'H4. Tout variant qui affecte le domaine acide va donc avoir un effet structural: par exemple H2AZ a une plus longue séquence participant à ce domaine, ce qui conduirait à des nucléosomes plus stables à l'inverse de H2A.B (Fan et al., 2002). Le domaine acide recrute certains facteurs de régulation de la transcription comme RCC1 ou LANA (Makde et al., 2010) ou de la réparation comme RNF168 (Leung et al., 2014; Mattioli et al., 2014).

H2AZ remplace H2A dans 10% des nucléosomes. Il est essentiel chez la souris mais pas chez la levure (Redon et al., 2002) et ses fonctions chez l'humain comparées à la levure sont encore discutées (pour revue voir (Billon and Cote, 2013)). Chez les eucaryotes supérieurs, H2AZ est retrouvé autour du site d'initiation de la transcription (TSS) et au niveau de séquences de régulation telles que des *enhancers*. De plus, sa présence corrèle avec le niveau de transcription suggérant un rôle d'activateur de l'expression des gènes. Il est aussi enrichi au niveau de domaines chromatinien péri-centromériques ou télomériques et semble jouer un rôle dans l'identité des frontières hétérochromatiniennes. H2AZ est incorporé par 2 complexes de remodelage ATP-dépendant : SRCAP et TIP60 chez les mammifères qui correspondent à SWR1 chez la levure (Latrick et al., 2016; Ranjan et al., 2015).

H2AZ peut être acétylé en N-terminal uniquement au sein de la chromatine suggérant que cette modification n'a pas de rôle dans son incorporation. Particulièrement, H2AZ est acétylé au niveau des promoteurs et corps (ou *ORF*) des gènes activement transcrits. Ceci affecterait le positionnement des nucléosomes notamment au niveau du TSS (Guillemette et al., 2005). De plus chez la levure, des mutants ponctuels montrent des défauts de ségrégation des chromosomes (Keogh et al., 2006b). Finalement, ce variant a été impliqué dans la réparation de l'ADN où il serait incorporé de façon transitoire pour affecter la structure de la chromatine localement au site de dommage de l'ADN (Kalocsay et al., 2009; Taty-Taty et al., 2014; Xu et al., 2012b).

H2AX présente une extension de la queue C-terminale et possède une séquence particulière de reconnaissance (SQ) d'enzymes de la famille des kinases PIKK (*phosphatidylinositol 3 kinase related kinases*). En réponse à des dommages à l'ADN, H2AX va jouer un rôle crucial à travers sa phosphorylation par ATM et ATR sur la Sérine 139 alors appelé γ H2AX (voir partie 3). On considère γ H2AX comme un biomarqueur de l'instabilité du génome et une cible thérapeutique potentielle majeure. Le variant H2AX n'est cependant pas essentiel et le *knock out* (KO) est viable chez la souris. De façon intéressante chez la drosophile, le variant H2Av correspond à une fusion de H2AX et H2AZ qui conserve

le site de phosphorylation. H2AX représente environ 10% de H2A total et semble réparti dans le génome au niveau de sites fragiles qui sont répliqués en début de phase S (Seo et al., 2014). Les régions sous-télomériques et les gènes hautement transcrits sont aussi enrichis en H2AX alors que l'hétérochromatine est déplétée. Ceci suggère que H2AX prépare la chromatine pour certains processus et potentiellement stabilise la fourche de réplication dans les régions actives où il peut y avoir collision des diverses machineries (voir partie 3).

Structurellement différent, macroH2A contient un domaine C-terminal appelé macrodomaine de 30kDa. Les nucléosomes contenant macroH2A présentent une protubérance qui pourrait ainsi impacter la structure de la chromatine (Angelov et al., 2003). De plus, macroH2A possède 2 paralogues dont l'un d'eux seulement (macroH2A.1.1) serait capable de lier les polymères d'ADP-ribose (Karras et al., 2005). Cette caractéristique a été reliée à une fonction de ce variant durant la réparation des dommages de l'ADN (voir partie 3). MacroH2A jouerait un rôle dans l'inhibition de la transcription dans les autosomes et lors de l'inactivation du chromosome X (Angelov et al., 2003; Costanzi and Pehrson, 1998). Il est aussi retrouvé au sein des foyers d'hétérochromatine associés à la sénescence (SAHF) et de large domaines transcriptionnellement silencieux (Costanzi and Pehrson 1998; Zhang et al. 2005; Gamble et al. 2010; Tolstorukov et al. 2012). Son macrodomaine semble en effet bloquer la liaison de facteurs de transcription et de remodelage de la chromatine. Plus récemment, des expériences d'immunoprécipitation de la chromatine (ChIP) couplées à du séquençage à haut débit ont montré sa localisation au niveau de gènes actifs suggérant qu'il pourrait aussi être impliqué dans l'activation de la transcription dépendamment du contexte (Gamble and Kraus, 2010).

1.1.2.1.b Les variants d'H3

Il existe 2 variants majeurs d'H3 dont le plus divergent est CENPA/CenH3. Il est enrichi au niveau des centromères et sert à définir l'identité de ce domaine chromatinien. Il va y réguler l'assemblage des kinétochores en interagissant avec différentes protéines de structure CENP-B,C, N du kinétochore via son domaine CATD (*CENPA Targeting Domain*). Il joue donc un rôle lors de la mitose dans la séparation des chromatides sœurs. De plus, CENPA est capable de s'assembler en octamères qui seraient moins stables au sein de la chromatine. L'étude structurale révèle qu'il utiliserait des boucles de 121 pb d'ADN ou lieu de 147 mais ce lien structure-fonction reste encore débattu. CENPA est incorporé par son chaperon HJURP et ce dépendamment du cycle cellulaire. De manière intéressante, cette interaction est sous la dépendance de modifications post-traductionnelles d'H3 sur les résidus K124 (ubiquitylation) et

S68 (phosphorylation). HJURP se localise au niveau centromérique de façon concomitante (Gurard-Levin et al., 2014).

H3.3 diffère de H3.1 de seulement 5 résidus et de 4 résidus pour H3.2. Ce variant est transcrit tout au long du cycle cellulaire et peut être incorporé en dehors de la phase S (Ahmad and Henikoff, 2002). Il semble disséminé au sein du génome dans l'euchromatine, au niveau des télomères et des régions péri-centromériques. La présence d'H3.3 semble faciliter l'ouverture de la chromatine et on retrouve ce variant au TSS de gènes transcrits, au niveau de certaines régions régulatrices (*enhancer*) et dans la région codante des gènes (Goldberg et al., 2010). De plus, l'activation de la transcription cible elle-même l'incorporation de H3.3 (Schwartz and Ahmad, 2005). Notamment sa fonction d'activateur semble liée à H2AZ car on observe une colocalisation de ces 2 variants. Cependant H3.3 semble aussi corrélée avec la chromatine silencieuse par exemple pour l'inactivation du chromosome X (van der Heijden et al., 2007). Il est aussi incorporé aux promoteurs de gènes de développement faiblement transcrits dans les cellules ES (Banaszynski et al., 2013). D'autre part, il joue un rôle au niveau des centromères où il pourrait cibler CENPA. H3.3 est donc ambivalent et cette double fonctionnalité pourrait être dépendante de ses 2 chaperons. En effet, il est incorporé par DAXX aux régions péri-centromériques et aux télomères et par HIRA au niveau des gènes transcriptionnellement actifs (Goldberg et al., 2010). L'incorporation de H3.3 ne traduit pas une fonction en particulier et semble devoir être corrélée avec d'autres facteurs de régulation de la chromatine (modifications post-traductionnelles spécifiques, H2AZ etc). Finalement, des mutants ponctuels de H3.3 ont été identifiés dans certains cancers. Environ 80% des gliomes chez l'enfant sont caractérisés par les mêmes substitutions dans la queue N-terminale de H3.3 (Yuen and Knoepfler, 2013).

1.1.2.2 Les modifications post-traductionnelles des histones

Les modifications post-traductionnelles (PTM) des histones forment le code des histones défini comme un langage de modifications covalentes des histones (Strahl and Allis, 2000). Selon Strahl et Allis à l'origine de cette hypothèse, "il existe de multiples modifications des histones, qui agissent en combinaison ou de manière séquentielle sur une ou plusieurs queues d'histones et qui ont pour conséquence des fonctions uniques". Les principales modifications sont l'acétylation, la méthylation, l'ubiquitylation et la phosphorylation. Il existe une interrelation entre certaines PTM en *cis* (sur la même histone) ou en *trans* (sur des histones différentes) conduisant à des combinaisons complexes de modifications au sein de la chromatine. Certains résidus peuvent subir plusieurs types de modifications,

mutuellement exclusives, ce qui suggérerait un mécanisme de compétition. Étant donné qu'un nucléosome peut être modifié de manière symétrique ou asymétrique, ceci conduit à un niveau de complexité très important du code histone.

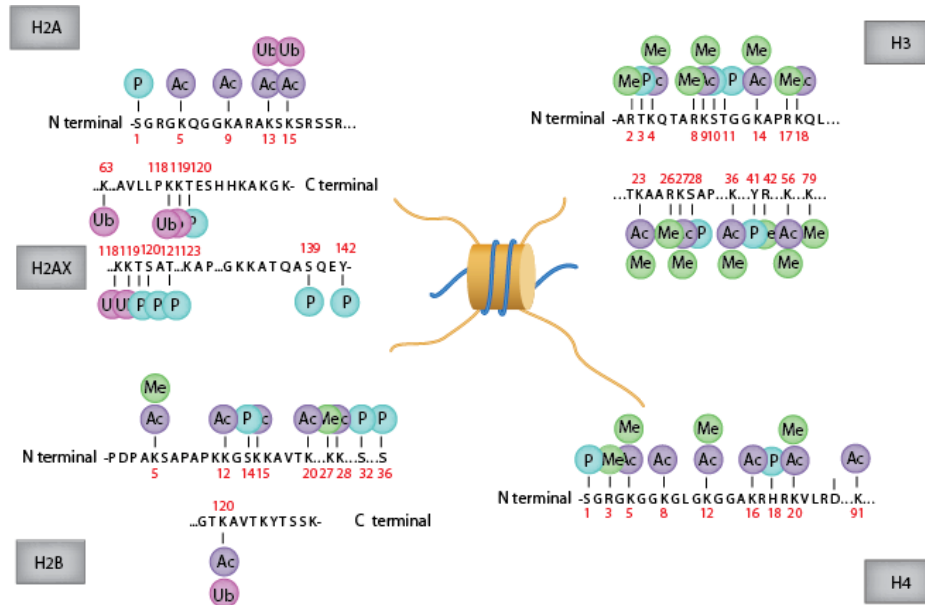


Figure 1.4: Principales modifications post-traductionnelles des histones. Phosphorylation (P), méthylation (Me), acétylation (Ac) et ubiquitylation (Ub) sont les modifications principales observées sur les queues N- et C-terminales des histones canoniques ainsi que du variant H2AX qui nous intéresse ici. Certaines modifications ont encore une fonction indéterminée (adapté de (Rodriguez-Paredes and Esteller, 2011)).

Ces PTMs ont pour fonction de modifier la structure de la chromatine ou de recruter des facteurs spécifiques. Elles sont déposées par des enzymes (*writer*), reconnues par des facteurs spécifiques (*reader*) qui contiennent des domaines protéiques particuliers et effacées par d'autres enzymes (*erasers*). Les lecteurs de marques sont retrouvés dans les protéines qui modifient elles-mêmes la chromatine ou qui régulent des interactions moléculaires lors de la transcription, la réplication et la réparation. *L'implication des PTMs des histones au cours du maintien de la stabilité du génome sera décrite en partie 3 du chapitre 1.*

1.1.2.2.a L'acétylation

C'est la première PTM identifiée et la plus intensivement étudiée en terme de régulation. L'acétylation des histones correspond au transfert d'un groupement acétyle de l'acétyl-coenzyme-A (AcoA) vers la chaîne latérale des lysines sur le groupement ϵ -amine (figure 1.5). Elle a pour effet de neutraliser sa charge positive qui engage une liaison électrostatique avec les phosphates de l'ADN ayant pour conséquence de relâcher la structure de la chromatine. De plus, on considère que l'acétylation de la lysine 16 sur l'histone H4 va bloquer les interactions intra et inter-nucléosomales à travers le domaine acide de H2A-H2B (Shogren-Knaak et al., 2006).

L'acétylation de la chromatine est sous le contrôle d'enzymes appelées lysines acétyltransférases (KAT) qui sont réparties en plusieurs groupes selon la conservation de leur domaine catalytique. L'acétylation est reversée par des déacétylases (KDAC), elles aussi réparties en plusieurs groupes selon leurs caractéristiques biochimiques et leur conservation. À noter qu'il n'existe pas de site consensus d'acétylation et ce quelque soit l'enzyme.

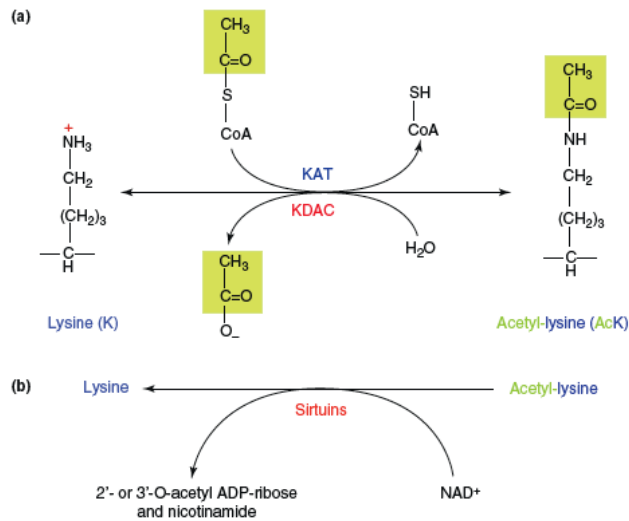


Figure 1.5: La réaction d'acétylation. Elle est réversible et régulée par des lysines acétyltransférases (KAT) et lysines déacétylases (KDAC). Le groupement acétyle est lié sur la chaîne latérale d'une lysine; le donneur de groupement acétyle est l'acétyl-coenzyme A ; le produit de la réaction de déacétylation est soit (a) l'acétate dans le cas de la famille Rpd3/sin3 ou (b) du nicotinamide ainsi que l'ADP-ribose dans le cas des sirtuins à partir du NAD⁺ (adapté de (Kim and Yang, 2011)).

1.1.2.2.a.i Les acétyltransférases (KAT)

Il existe 5 familles de KAT définies selon la conservation de séquence de leur domaine catalytique, les principales étant p300/CBP, les GNAT (*Gcn5 related acetyltransferases*) et les MYST (Moz, Ybf2/Sas3, Sas2, Tip60) qui vont principalement nous intéresser (tableau 1.1). Brièvement, CBP et p300 forment la famille du même nom et sont 2 paralogues présentant une forte homologie. Elles ne fonctionnent pas en complexes protéiques et de ce fait ciblent les 4 histones avec moins de spécificité. Ce sont des activateurs de la transcription impliqués dans la croissance et le développement, notamment la différenciation cellulaire, la migration et l'apoptose (Dancy and Cole, 2015). Elles ciblent également de nombreux substrats non histones (Iyer et al., 2004)

La famille des GNAT comprend les complexes PCAF, SAGA, STAGA, TFTC et ATAC (Steunou et al., 2014). Ils contiennent une enzyme qui présente des similarités avec la protéine Gcn5 chez la levure. Ces enzymes présentent un domaine catalytique conservé associé le plus souvent à un bromodomaine en C-terminal (Dyda et al., 2000). Certaines sous-unités associées à l'enzyme possèdent des domaines de lectures de la chromatine et sont essentielles pour son fonctionnement et son ciblage au sein du génome. Par exemple, chez la levure Gcn5 isolée acétyle H3K14 sur les histones libres, H3K9/14/18/23 dans SAGA et H3K9/14/18 dans un sous-complexe distinct ADA. SAGA est un large complexe d'environ 18 sous-unités qui a la particularité de contenir également une activité déubiquitylase à travers sa sous-unité USP22. Ses 2 activités en font un important activateur de la transcription (Bonnet and Palancade, 2014). Également, le complexe ATAC possède une seconde acétyltransférase ATAC2 et peut ainsi cibler à la fois H3 et H4 (Suganuma et al., 2008).

Famille	Enzyme	Complexe	Composition
CBP/p300	CBP/KAT3A	no	/
	P300/KAT3B	no	/
GNAT	Gcn5,PCAF/ KAT2A,B +	ATAC	2 enzymes + autres sous-unités (~15)
	PCAF,Gcn5/KAT2A,B	TFTC PCAF SAGA/STAGA/ADA	TRRAP+USP22+ autres sous-unités (~8-16)
MYST	Mof /KAT8	MOF	MSL1,+/-2,3 ou NSL1,2,3 +/- autres
	Moz/Morf, KAT6A/B	MOZ/MORF	MEAF6, ING4/5, BRPF1
	Hbo1/KAT7	HBO1	MEAF6, ING4/5, Jade1/2/3 / BRPF2/3
	Tip60/KAT5	TIP60	voir partie 2

Tableau 1.1: Les principales familles de lysines acétyltransférases (KAT) chez l'humain. La composition des complexes de la famille des GNAT est encore discutée alors que les MYST sont bien caractérisées (Steunou et al., 2014).

Les enzymes MYST sont organisées en complexes multiprotéiques hautement conservés au cours de l'évolution de *S. cerevisiae* à l'humain (pour revue voir (Avvakumov and Cote, 2007)). Chez l'homme, elles composent les complexes MOF, MOZ/MORF, HBO1 et TIP60. Les enzymes de chaque complexe ont la particularité de posséder un domaine catalytique MYST (Marmorstein and Trievel, 2009). De plus les complexes HBO1, MOZ/MORF et TIP60 sont construits sur le même modèle avec un cœur enzymatique minimal tétramérique contenant l'enzyme, la protéine MEAF6, un membre de la famille des ING (ING3, 4 ou 5) et une protéine d'échafaudage qui relie l'ensemble de ces éléments. De la même façon, les sous-unités associées possèdent aussi des domaines de lecture de la chromatine. TIP60 se démarque par son nombre élevé de sous-unités: c'est le plus imposant et diversifié des complexes de la famille à enzymes MYST (voir partie 2).

Fonctionnellement, HBO1 correspond à piccolo-NuA4 chez la levure (voir partie 2). Il contient ING4 ou 5 selon le type cellulaire et Jade est sa sous-unité d'échafaudage. Il existe plusieurs paralogues de Jade (Jade 1, 2 ou 3) et Jade1 possède aussi deux variants d'épissage Jade1S et Jade1L (Avvakumov et al., 2012). Ces 2 variants possèdent un domaine différentiel impliqué dans la liaison de la protéine ING. En conséquence, le variant court ne permet plus le ciblage au promoteur à travers la liaison de H3K4me3 par ING4/5 et se retrouve localisé sur la région codante (Avvakumov et al., 2012). Le complexe HBO1 est responsable de l'acétylation globale de H4K5, 8, 12 et joue un rôle lors de la réplication et la transcription (Doyon et al., 2006). Initialement HBO1 a été co-purifié avec les protéines ORC1 et MCM2 (Iizuka and Stillman, 1999). Il est responsable de l'acétylation de l'histone H4 aux origines de réplication et serait un activateur de l'assemblage du complexe de pré-réplication (Burke et al., 2001).

MOZ/MORF correspond à NuA3 chez la levure. Sa sous-unité d'échafaudage est BRPF1, 2 ou 3 et contient uniquement ING5 (Doyon et al., 2006). Moz et Morf sont 2 paralogues mutuellement exclusifs au sein du complexe. Les 2 enzymes présentent environ 60% d'identité et sont les homologues de Sas3 chez la levure (Yang and Ullah, 2007). Le complexe MOZ/MORF est impliqué dans la régulation de la transcription et la réplication et semble responsable de H3K23ac dans la chromatine (Huang et al., 2014a).

Le complexe hMOF diffère des autres complexes MYST du point de vue architectural. La sous-unité enzymatique Mof est retrouvée dans plusieurs complexes distincts. Le complexe MOF-MSL classique contient les protéines MSL1, MSL2 et MSL3 (*Male Specific Lethal*) alors que MOF-MSL1v1 contient MSL1, PHF20 ainsi que d'autres facteurs. Finalement, Mof peut aussi être associée aux protéines NSL1, NSL2 et NSL3 (*Non Specific Lethal*) ainsi qu'à d'autres sous-unités dont MRG15 (Li et

al., 2005; Li et al., 2009b; Mendjan et al., 2006; Smith et al., 2005). Mof est l'homologue de Sas2 chez la levure. Chez la drosophile, MOF-MSL catalyse l'hyper-acétylation de H4K16 pour l'activation de la transcription sur le chromosome X. Il est responsable de la compensation de dosage qui rétablit l'expression des gènes situés sur les chromosomes sexuels chez les males et les femelles (Akhtar and Becker, 2000). Chez l'humain, MOF-MSL est responsable de la majorité de H4K16ac dans la cellule (Smith et al., 2005). Ainsi, le complexe est aussi impliqué dans la réparation de l'ADN ((voir partie 3); (Sharma et al., 2010)).

Les KAT ont la particularité d'être régulées via un mécanisme d'auto-acétylation. L'analyse de la structure d'Esa1 et Mof couplée à des études par spectrométrie de masse et des essais biochimiques, a révélé un transfert de groupement acétylé sur l'enzyme au niveau d'un résidu particulier du domaine catalytique MYST (Yan et al., 2002; Yuan et al., 2012). L'autoacétylation de ce résidu conservé conduit à un changement de conformation et impacte plus ou moins l'activité selon l'enzyme. Plus précisément, il est nécessaire à la liaison des substrats et à leur acétylation subséquente. Ce mécanisme est vrai pour les MYST, avec des subtilités selon le complexe, mais semble être un mécanisme général de régulation des KATs puisqu'il est aussi observé chez p300 et CBP (Thompson et al., 2004). Finalement, en plus d'acétyler la chromatine et elles-mêmes, elles ciblent toutes des protéines non histones comme des facteurs de transcription, des protéines de signalisation ou impliquées dans l'autophagie (Sapountzi and Cote, 2011; Smith and Workman, 2009).

Il existe une certaine dynamique des sous-unités et une malléabilité de la composition de ces complexes MYST (Lalonde et al., 2013). En effet, HBO1 peut s'associer à une autre protéine d'échafaudage, BRPF1, pour acétyler H3K14 et K23. De la même façon, Moz peut s'associer avec Jade1 et cibler H4, suggérant un rôle de la protéine d'échafaudage dans la spécificité de ciblage afin d'exécuter des fonctions tissus-spécifiques, au cours du développement et potentiellement dérégulées dans certains cancers.

1.1.2.2.a.ii Les histones déacétylases (HDAC)

Il existe 4 différentes familles de HDAC selon leur conservation au cours de l'évolution et leur fonctionnement (Steunou et al., 2014; Yang and Seto, 2008). Les HDAC classiques dépendantes du zinc forment les classes I, II et IV. La classe I contient des homologues de Rpd3 chez la levure et contient HDAC1, 2, 3 et 8 qui sont nucléaires. La classe II est définie par rapport à l'homologie avec Hda1, qui est la sous-unité catalytique du complexe HDA1 et a un rôle de répresseur de la transcription (Martin et al.,

2007). Cette famille est globalement cytoplasmique et contient HDAC4, 5, 6, 7, 9, 10. Dans les cellules ES, HDAC6 est nucléaire et active la transcription des gènes de pluripotence. Elle est ensuite transloquée dans le cytoplasme au cours du développement (Chen et al., 2013b). La classe III regroupe la famille des Sirtuins selon l'homologie avec la protéine de levure Sir2. Le complexe SIR (Sir1, 2, 3 et 4) joue un rôle dans la formation de l'hétérochromatine au niveau du télomère chez la levure (Altaf et al., 2007). Sir3 et Dot1 lie le même domaine au sein de la chromatine sous la dépendance de H4K16ac par Sas2. Dot1 en méthylant H3K79me bloque la déacétylation de la chromatine par le complexe SIR et donc la propagation de la frontière hétérochromatinienne. Il existe 4 sous-groupes de sirtuins, elles sont toutes dépendantes du NAD⁺ et spécifiquement inhibées par le nicotinamide. À noter que HDAC11 ferait maintenant partie d'une classe de HDAC à part entière (classe IV).

Alors que les sirtuins sont actives seules *in vitro*, les HDAC classiques fonctionnent en complexes multiprotéiques. HDAC1 et 2 sont retrouvées au sein des complexes Sin3A, Sin3B, NuRD et CoREST (pour revue (Yang and Seto, 2008)). Elles sont impliquées dans de nombreux processus comme la transcription et la réparation de l'ADN (voir partie 3). Chez la levure, Rpd3 est retrouvée au sein de 2 complexes multiprotéiques Rpd3S et Rpd3L appelés Sin3B et A chez l'humain. Ces 2 complexes sont impliqués dans la régulation de la transcription à différents niveaux (Carrozza et al., 2005a; Carrozza et al., 2005b; Keogh et al., 2005). Sin3A contient ING1/2 le ciblant à la région promotrice, alors que Sin3B contient MRG15, un lecteur de H3K36me3 qui cible le complexe sur la région codante des gènes (Joshi and Struhl, 2005; Shi et al., 2006). MRG15 est aussi une sous-unité de TIP60 et participe à sa régulation au cours de la transcription. Comme les KATs, les HDACs ou KDACs ne ciblent pas que des histones: les KAT comme Tip60 sont aussi déacétylées (voir partie 2) tout comme les protéines de réparation (voir partie 3).

1.1.2.2.a.iii Les domaines de reconnaissance de l'acétylation des histones

L'acétylation de la chromatine provoque sa relaxation. De plus, l'acétylation des histones est liée par des facteurs spécifiques. L'acétylation des lysines est reconnue majoritairement par des bromodomaines (BRD; tableau 1.2). Il existe 46 protéines à bromodomaine chez l'humain réparties en 8 familles selon leur séquence et structure (Filippakopoulos et al., 2012). Leur structure forme une poche hydrophobe constituée de 4 hélices- α contenant un résidu asparagine qui engage une liaison hydrogène avec l'acétyl-lysine. À ce jour, peu de marques ont été reliées à un lecteur particulier, dû aux faibles interactions entre les BRDs et leurs cibles potentielles (Filippakopoulos and Knapp, 2014; Muller et al., 2011). De plus, les BRDs sont souvent associés à d'autres domaines de lecture de marques

épigénétiques (PHD, BAH etc). Les protéines à BRD font souvent partie de complexes d'activation de la transcription ce qui en fait des cibles thérapeutiques de choix. Le développement d'inhibiteurs spécifiques est basé sur l'utilisation de compétiteurs d'acétyl-lysine (Filippakopoulos and Knapp, 2014).

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

Tableau 1.2: Principales modifications post-traductionnelles des histones et exemples de domaines de lecture (adapté de (Musselman et al., 2012b)). ADD: ATRX-DNMT3-DNMT3L; BAH: bromo-adjacent homology; DCD : double chromodomain; MBT : Malignant Brain Tumor; PHD : Plant homology; TTD : Tandem Tudor Domain; zf-ZW : zinc finger CW; DBD : double bromo-domain; DPF : double PHD finger; BIR : baculovirus inhibitor of apoptosis protein repeat; BRCT : BRCA1 C terminus. L'ubiquitylation est à ajouter ici ainsi que ces multiples domaines de lectures (UDB). L'absence de modification est aussi une marque reconnue par certains lecteurs. L'interaction entre les marques et leur domaine fonctionne selon un modèle de type clé/serrure.

Récemment, les domaines YEATS se sont aussi révélés comme des lecteurs de la chromatine acétylée. Il existe 4 protéines à domaine YEATS chez l'humain (dont YEATS4, voir partie 2) qui sont toutes associées à des complexes de régulation de la chromatine (Schulze et al., 2009). AF9 reconnaît H3 acétylée sur K9, K18 et K27 et cible notamment la méthylation de H3K79 par Dot1 au sein du génome à travers la liaison de H3K9ac (Li et al., 2014). D'autre part, il existe d'autres domaines de lecture comme les domaines DPF (*double PHD finger*) qui reconnaissent l'acétylation de H3 (Zeng et al., 2010). Finalement, certains domaines tandem PH (*pleckstrin homology*) reconnaissent l'acétylation, comme

Rtt106 qui lie H3K56Ac (Su et al., 2012) mais ils peuvent aussi reconnaître les histones non-modifiés.

L'acétylation des histones est impliquée dans de nombreuses fonctions, mais globalement elle crée de la chromatine permissive à travers sa relaxation. L'acétylation est donc majoritairement impliquée dans l'activation de la transcription et les processus qui nécessitent l'accès à l'ADN (pour revue (Steunou et al., 2014)).

1.1.2.2.b La méthylation

La méthylation correspond au transfert d'1 à 3 groupements méthyle et cible principalement les lysines au sein des histones. De plus, les arginines peuvent être méthylées de façon symétrique ou asymétrique. Elle est catalysée par des histones méthyltransférases (HMT) et effacée par des déméthylases. On considère 2 groupes de HMT: les enzymes ciblant des lysines (KMT) et celles ciblant les arginines (PRMT). De plus, parmi les HMT on distingue la famille des protéines à domaine SET (*Su(var)*, *Enhancer of zeste*, *Trithorax*), des non-SET qui comprennent uniquement Dot1/Dot1L. Elles utilisent toutes le S-adenosyl-L-méthionine comme donneur de méthyle. Le domaine SET comprend environ 130 acides aminés et a été identifié originalement chez la drosophile à partir de mutants suppresseur de variegation. Il existe 7 sous-familles basées sur des motifs conservés entourant le domaine SET (Dillon et al., 2005). Dot1 a été identifiée par recherche d'homologie chez la levure et cible H3K79 (Lacoste et al., 2002; Ng et al., 2002; van Leeuwen et al., 2002). Son homologue chez l'humain, DOT1L, a été identifié à posteriori par homologie de séquence (Feng et al., 2002).

Il existe 2 familles de déméthylases: les LSD (*lysine spécifique demethylase*) et les Jumonji (Jmj) regroupées selon leur biochimie et leur conservation (Klose et al., 2006). La famille LSD possède un domaine amine oxydase et utilise le FAD comme cofacteur. Les LSD sont capables d'éliminer la mono- et di-méthylation uniquement. La famille Jmj a un domaine dioxygénase dépendant du Fe(II) et de l' α -ketoglutarate (Marmorstein and Trievel, 2009). C'est la famille la plus importante de déméthylases, qui sont capables de cibler les 3 niveaux de méthylation. Certaines Jmj seraient aussi capables de cibler les arginines (Chang et al., 2007). Finalement les déméthylases d'arginines (PADI) ne sont pas considérées comme des déméthylases d'histones à proprement parler car elles ne reversent pas la méthylation et conduisent à la citrullination des arginines (voir autres PTM des histones).

Au sein de la chromatine, la méthylation de l'ADN a été la première décrite comme ayant une fonction répressive. Au contraire celle des histones est plus complexe et peut être activatrice ou inhibitrice. Elle est abondante, cible de nombreux résidus sur les 4 histones et sert de site de recrutement

de protéines de régulation. Par exemple, H3K9me3 est une marque d'hétérochromatine bien caractérisée déposée par la première protéine SET identifiée SUV(39)H1 (KMT1A). H3K9me3 est reconnue par le facteur structural HP1 et participe à la compaction de l'hétérochromatine. De la même façon, H3K27me3 est une marque d'inhibition de la transcription catalysée par EZH2 au sein du complexe PRC2. À l'inverse, la triméthylation de H3K4 par SET1 est une marque détectée aux promoteurs de gènes actifs pour le recrutement de la machinerie de transcription. Un dernier exemple est la triméthylation de H3K36 par SET2 qui est retrouvée dans le corps et le 3' UTR des gènes transcrits. Elle serait impliquée dans la stabilisation des nucléosomes pendant l'élongation de la transcription, la régulation de la transcription cryptique et l'épissage (Carozza et al., 2005b; Keogh et al., 2005; Schwartz et al., 2009).

D'autre part, la modification d'un même résidu peut avoir des fonctions différentes selon son degré de méthylation. Un exemple qui va particulièrement nous intéresser est celui de la méthylation de H4K20 (van Nuland and Gozani, 2016). Cette marque est très abondante chez l'humain (plus de 80% d'H4), n'existe pas chez *S.cerevisiae* et apparaît chez *S.pombe*. Elle est dynamique au cours du cycle cellulaire et semble impliquée dans la réplication, la transcription et le maintien de la stabilité du génome (voir partie 3). H4K20me1 augmente en phase G2/M alors que H4K20me2 augmente progressivement en phase S (Alabert et al., 2015; Jorgensen et al., 2013). De plus, sa régulation est encore mal comprise notamment les enzymes qui régulent sa dynamique sont peu caractérisées.

H4K20me3 est retrouvée dans l'hétérochromatine, les régions péri-centromériques et répétées et les télomères. La mono- et la diméthylation sont plus largement distribuées et H4K20me1 est étonnamment observée sur le corps des gènes activement transcrits (Barski et al., 2007). H4K20me2 est liée par le complexe de pré-réplication via le domaine BAH de ORC1 aux origines de réplication (Kuo et al., 2011). Elle va permettre d'inhiber la re-réplication à l'origine d'instabilité génomique. Finalement, la mono et la diméthylation sont aussi reconnues par des régulateurs importants de la réponse aux dommages comme L3MBTL1, JmjD2a et 53BP1 aux sites de cassures double-brin de l'ADN (voir partie 3).

Les KMT de H4K20 sont PrSet7 (Set8/KMT5A) et Suv420H1/2 (KMT5B/C) (Nishioka et al., 2002). SET8 catalyse la mono-méthylation de H4K20 alors que Suv420H1/2 seraient responsables de la di- et la tri-méthylation à partir de H4K20me1. Chez la souris, Suv420H1 semble catalyser la diméthylation et H2 la triméthylation. Les souris simple-KO Suv420H1 ou Suv420H2 ont des phénotypes différentiels et les souris double-KO montrent des défauts de prolifération avec un blocage en S/G1. Logiquement, le KO SET8 possède un phénotype plus sévère et sa délétion est létale chez la drosophile (Fang et al., 2002). Le double KO Suv39H1/H2 dans les MEFs abolit la triméthylation de H4K20 dans l'hétérochromatine péri-centromérique, suggérant que les KMT sont recrutées via HP1 et qu'il existe une

interrelation avec H3K9me3 et H4K20me (Schotta et al., 2004). La protéine SMYD5 serait aussi capable de catalyser H4K20me3 aux promoteurs de gènes mis sous silence dans les macrophages (Stender et al., 2012).

PHF8 serait la principale déméthylase de H4K20. Elle fait partie de la famille des Jumonji et semble déméthylater H4K20me1 uniquement dans un contexte chromatinien pendant les phases G1 et S du cycle cellulaire. Il n'y a pas d'enzymes identifiées ciblant la di- et tri-méthylation exceptée PHF2 qui serait spécifique de H4K20me3 pour l'activation de la transcription (Stender et al., 2012). Il y a une régulation de H4K20me durant le cycle cellulaire car SET8 est dégradée pendant la phase G1 induisant une chute de H4K20me1 jusqu'en phase S où la marque est diluée durant la réplication. La méthylation augmente ensuite à partir de la transition S/G2 pour atteindre un pic en mitose (Jorgensen et al., 2013). H4K20me1 est liée par Condensin II permettant le recrutement du complexe Cohesin en prophase (Tanaka et al., 2012)

Les domaines de reconnaissance de la méthylation des lysines sont les plus diversifiés (voir tableau 2; (Musselman et al., 2012b)). Ils ont la caractéristique commune de posséder une cage hydrophobe contenant plusieurs résidus aromatiques, qui va pouvoir accommoder les différents degrés de méthylation, de part sa taille et sa composition. La spécificité de substrat va aussi être guidée par les résidus entourant cette poche hydrophobe. Certains domaines sont regroupés selon leur origine évolutive commune et qualifiés de "*Royal family*". Ce groupe comprend: chromodomaine, Tudor, PWWP et MBT qui ont une structure en tonneau composée de feuillets- β (ou *β -barrel*) (Maurer-Stroh et al., 2003).

Le CHD (*Chromodomain*) canonique est formé de 4 feuillets- β et d'une hélice- α C-terminale. Il peut présenter des polymorphismes structuraux donnant lieu aux termes de *chromo-shadow* domaine ou domaine *chromobarrel*. Certains CHD ont également des propriétés de liaison aux acides nucléiques (Akhtar et al., 2000; Shimojo et al., 2008). La structure et spécificité des CHD de Tip60 et MRG15 seront discutées en partie 2.

Les autres membres de la famille ont une structure de tonneau- β composée de 4 feuillets- β . Les Tudor sont composés d'environ 50 acides aminés et sont présents dans un grand nombre de protéines. Ils sont très diversifiés et peuvent être présents en tandem comme dans 53BP1. Son domaine Tudor en tandem (TTD) reconnaît H4K20me1/2 comme Crb2, son homologue chez *S.pombe* (Botuyan et al., 2006).

Enfin les domaines MBT (*Malignant Brain Tumor*) vont reconnaître des degrés de méthylation plus faibles notamment de H4K20 (Kim et al., 2006). Les protéines à domaine MBT sont conservées de la drosophile à l'humain. Il existe une dizaine de protéines à domaine MBT chez les mammifères. Elles

présentent une répétition de domaines MBT de 1 à 4 domaines en tandem. Un domaine MBT est formé d'une centaine d'acides aminés selon une structure en hélice ou "*propeller-like*". En général, un seul des MBT contient les résidus aromatiques au sein de la cage hydrophobe nécessaires à la liaison des/du groupement(s) méthyle(s). Les autres domaines (si présents) sont là pour structurer l'ensemble dans l'espace (Eryilmaz et al., 2009). Par exemple, L3MBTL1 possède 3 domaines MBT spécifiques pour H4K20me1/2 et H1bK26me1/2 (Trojer et al., 2007). Ce facteur est impliqué dans la répression de la transcription et dans la réparation des CDBs (Acs et al., 2011; Trojer et al., 2007) (voir partie 3).

À cette famille se rajoute les domaines WD40 et PHD (Musselman and Kutateladze, 2011). Le PHD est un domaine à doigt de zinc de type C4HC3 de structure globulaire qui coordonne le zinc. En général ils ont un haut degré de spécificité pour un niveau de méthylation élevé comme les protéines ING pour la marque H3K4me3 (voir partie 2). Ils ont aussi la particularité de lier les phosphatidylinositol-phosphates ((Gozani et al., 2003); Steunou et al en préparation)). L'exemple du PHD d'ING3 sera décrit en partie 2. Les domaines WD40 sont formés d'un motif structural d'une quarantaine d'acides aminés, se terminant par un tryptophane et un acide aspartique (W et D), répétés en tandem pour former une structure circulaire de type propeller- β . Ils sont très versatiles et sont impliqués dans les interactions protéine-protéine en général.

1.1.2.2.c L'ubiquitylation/ubiquitination

La réaction d'ubiquitylation correspond à la liaison covalente d'une protéine de 8,5 kDa (76 acides aminés) appelée ubiquitine sur la chaîne latérale des lysines. Elle trouve son origine évolutive chez la levure avec laquelle elle partage plus de 90 % d'identité de séquence. L'ubiquitine possède 7 lysines qui peuvent être impliquées dans des liaisons covalentes (K6, 11, 27, 29, 33, 48, 63). Il existe ainsi différents chainages de l'ubiquitine dépendamment de la lysine de l'ubiquitine impliquée dans la liaison covalente. En général, la mono-ubiquitylation ou la poly-mono-ubiquitylation sont impliquées dans des processus de signalisation alors que la poly-ubiquitylation (ou liaison de chaînes de poly-ubiquitine via K48) conduit son substrat à la dégradation par le protéasome (Mattioli and Sixma, 2014).

La réaction d'ubiquitylation nécessite l'hydrolyse de l'ATP et se fait en 3 temps, mettant en jeu des enzymes successives appelées E1, E2 et E3 ubiquitine-ligases. Il existe un millier de E3 réparties en 3 familles : les HECT (*Homologous to the E6AP Carboxyl terminus*), les RING (*Really Interesting New Gene*) qui contiennent un sous-groupe appelé CRL (Cullin-RING Ligase) et les RBR (*RING Between RING*) qui diffèrent selon leur mode de fonctionnement et de transfert de l'ubiquitine sur le substrat (pour revue (D'Arcy et al., 2015)). Le mode de reconnaissance et de spécificité de substrat est très différent

selon les groupes : il peut être coopératif ou dépendant de l'E3 seulement. Les familles d' E1 et E2 sont moins diversifiées.

Au sein de la chromatine, la mono-ubiquitylation joue un rôle de signalisation et semble principalement concentrée sur H2A et H2B (Meas et al., 2015). Un exemple bien connu est H2AK119ub qui est la marque principale d'ubiquitylation de H2A. Cette PTM est catalysée par le complexe PRC1 (*Polycomb Repressive Complex 1*) pour l'inhibition de la transcription. Au sein du complexe, l'E3 RING1B/BMI1 reconnaît son substrat sur H2A à travers son domaine catalytique (Leung et al 2014). De plus, la liaison de H4 par l'E2 UbcH5C semble orienter le complexe vers le résidu de façon spécifique. La reconnaissance est donc croisée et a lieu seulement quand H2A est incorporée au sein du nucléosome. Toutefois si K119 est mutée, K118 peut être modifiée, il existe donc une certaine redondance entre ces sites. Le complexe PRC1 est recruté via la triméthylation de H3K27 par PRC2. PRC1 va ensuite catalyser H2AK119ub afin de renforcer l'inhibition de la transcription et permettre l'éventuel recrutement de méthyltransférases de l'ADN (Kalb et al., 2014). De plus, PRC1 s'associe à des KDACs pour inhiber l'élongation de la transcription par l'ARN-polymérase-II. Cette modification a aussi un effet répressif sur la structure de la chromatine à travers l'inhibition du chaperon FACT au promoteur (Zhou et al., 2008). Elle facilite aussi la liaison de l'histone H1 conduisant à une compaction de la chromatine (Zhu et al., 2007). Finalement, PRC1 jouerait aussi un rôle durant la réparation de l'ADN, où il serait recruté sous la dépendance d'ATM pour réprimer la transcription localement via H2AK119ub au site de cassure double-brin ((Ui et al., 2015); voir partie 3)

Les enzymes qui enlèvent ou dégradent l'ubiquitine sont des dé-ubiquitylases (DUB) qui sont au nombre d'une centaine (D'Arcy et al., 2015). Elles sont réparties en 6 catégories selon leur domaine catalytique de type USP, OTU, UCH, MJD, JAMMs ou MCPiP, la famille des USP étant la plus représentée. Exceptées les JAMM qui sont des métalloprotéases dépendantes du Zn^{2+} , les USPs sont toutes des cystéine-protéases (Jackson and Durocher, 2013).

A ce jour, différents domaines de lecture de la chromatine ubiquitylée ou UDB ont été identifiés. Ce sont des domaines hétérogènes, capables de reconnaître les différents types de chaînes et répartis en plus de 20 classes comme les UIM, MIU, UMI, UBA, UBM et UBZ (Dikic et al., 2009). Par exemple, RNF168 contient 3 UBDs: MIU1 et MIU2 ainsi qu'un domaine UMI. Tous les 3 sont essentiels à sa fonction durant la DDR et au recrutement de 53BP1 (Pinato et al., 2011). D'autre part, le domaine UDR (*Ubiquitination-Dependent Recruitment*) de 53BP1 reconnaît H2AK15ub catalysée par RNF168 au sein de la chromatine (voir partie 3). Le domaine de l'ubiquitylation est en plein essor puisqu'on connaît peu les lecteurs, la spécificité des enzymes et la fonction des différents chainages ou branchages de

l'ubiquitine. Il est clair que l'ubiquitylation de la chromatine joue une fonction importante notamment pendant la réponse aux dommages de l'ADN (DDR; (Nishi et al., 2014) voir partie 3).

1.1.2.3 La phosphorylation

La phosphorylation cible les sérines et thréonines ainsi que dans une moindre proportion les tyrosines. Toutes les histones peuvent être modifiées par des kinases et des phosphatases. La phosphorylation conduit à l'addition de charges négatives et pourrait donc potentiellement avoir une fonction structurale au sein de la chromatine. Elle sert aussi de signal de recrutement de facteurs contenant des domaines de reconnaissance de la phosphorylation en général, comme les domaines FHA, BRCT ou 14-3-3.

Elle est impliquée dans la réparation de l'ADN, la transcription, la compaction de la chromatine durant la division cellulaire et l'apoptose (Rossetto et al., 2012). Parmi les phosphorylations des histones les mieux caractérisées, la phosphorylation de la sérine 139 sur le variant H2AX (γ H2AX) est impliquée dans la stabilité du génome (partie 3). En revanche, H2AX est aussi phosphorylé de manière ubiquitaire sur la tyrosine 142 et serait déphosphorylé en réponse à des dommages afin de réguler la stabilité des foyers de réparation (Xiao et al., 2009).

La phosphorylation de l'histone H3 sur 4 résidus est associée avec la condensation des chromosomes et leur ségrégation en mitose et en méiose. Parmi eux, H3S10ph est catalysée par Aurora B dès la fin de G2 et en début de mitose. Également, H2AT120ph marque les chromosomes métaphasiques, joue un rôle dans la régulation du cycle cellulaire et définit l'identité des centromères. La condensation de la chromatine et la fragmentation de l'ADN induites par l'apoptose impliquent la phosphorylation de H2B sur S14 par STK4 (Fernandez-Capetillo et al., 2004). Finalement, au cours de la transcription, la phosphorylation joue un rôle d'activateur et de répresseur (Nowak and Corces, 2004). Notamment, la phosphorylation de H3S10 est ciblée par H3K9ac pour l'acétylation subséquente de H4 et l'élongation de la transcription (Zippo et al., 2009).

Un exemple intéressant est la phosphorylation de H4 sur la Sérine 1. Elle est conservée au cours de l'évolution et régulée au cours du cycle cellulaire durant la mitose et la phase S (Barber et al., 2004). Chez la levure, H4S1ph joue un rôle dans l'élongation de la transcription, durant la sporulation et pendant la DDR. Elle va notamment inhiber l'acétylation de H4 par NuA4 sur les lysines adjacentes au cours de la restauration de la chromatine ((Utlely et al., 2005); voir partie 2).

1.1.2.4 Autres modifications des histones

La PARylation (ou poly-ADP-ribosylation) correspond à la liaison de polymères d'ADP-ribose linéaires ou branchés chargés négativement. Elle est catalysée par des PARP (*Poly-ADP-ribose polymerases*), dont la plus importante et mieux caractérisée est PARP1 sous la dépendance du NAD⁺. À l'inverse, le polymère est dégradé par des PARG (*PAR Glycohydrolases*). Cette modification cible les glutamates, les aspartates ainsi que les lysines des histones (Altmeyer et al., 2009). Elle participe à la relaxation de la chromatine dans la réponse précoce aux dommages de l'ADN et pour la régulation de la transcription ((Krishnakumar et al., 2008); voir partie 3). Les lecteurs de PAR sont au nombre de 8. Les 4 lecteurs majeurs sont PBM, PBZ, WWE et Macro-domain suivis de RRM, GAR, FHA et BRCT qui pour certains reconnaissent d'autres PTM de la chromatine (Krietsch et al., 2013). La PARylation de la chromatine semble très transitoire aux sites de dommages et serait impliquée dans le recrutement de facteurs comme ChFr ou BARD1 pour cibler d'autres modifications de la chromatine ((Hakme et al., 2008; Li and Yu, 2013; Oberoi et al., 2010); voir partie 3).

La sumoylation de la chromatine correspond à la liaison covalente d'une protéine SUMO (*Small Ubiquitin-like Modifier*) et appartient à la famille des modifications UBL (*Ubiquitin Like*). Il existe un orthologue de SUMO chez la levure appelé SMT3 et 4 isoformes chez l'humain (SUMO1, 2, 3 et 4 étant tissus-spécifiques) de 12kDa environ. Comme l'ubiquitylation, elle met en jeu 3 types d'enzymes pour le transfert d'un SUMO sur une lysine sous la dépendance de l'ATP. La diversité des enzymes semble limitée à une E1, une E2 (Ubc9) et une dizaine de E3 (Jackson and Durocher, 2013). La sumoylation est clivée par des peptidases appelées SENP dont il existe 6 isoformes (Kumar and Zhang, 2015). La fonction de la sumoylation est exclusivement liée à la signalisation et ne constitue pas un signal de dégradation. Les lecteurs de la sumoylation sont appelés des SIM (*SUMO Interacting Motif*). Chez l'humain, l'histone H4 est sumoylée sur la lysine 12 et entrainerait une répression de la transcription (Nathan et al., 2006; Shiiro and Eisenman, 2003). Cette marque ne possède pas de lecteur à proprement parler mais jouerait un rôle de blocage de l'acétylation par compétition (Nathan et al., 2003).

La neddylation est un membre récent de la famille des UBL et correspond à la liaison covalente de NEDD8 (*neural precursor cell expressed developmentally downregulated protein 8*) sur les lysines. Bien que cette protéine possède un fort pourcentage d'identité avec l'ubiquitine (60%), elles ne partagent cependant pas les enzymes de conjugaison. Cette modification nécessite aussi d'être transférée via plusieurs étapes de conjugaison (E1, E2, E3 ligases). NEDD8 possède un orthologue chez la levure *S.*

cerevisiae appelé Rub1. Quelques protéases appelées dé-neddylases ont été identifiées et semblent pouvoir enlever les conjugués de NEDD8, et certaines de ces enzymes sont aussi des DUB. Il n'existe pas de domaine de lecture caractérisé à ce jour. Au sein de la chromatine, H4 et H2A sont des substrats neddylés notamment durant la réparation.

Finalement, on peut citer la crotonylation des histones, la citrullination, la proline-isomérisation, l'acylation (K), la glycosylation (S), la propionylation et la butyrylation. La liste ne cesse de s'accroître et l'identification de nouvelles types de modification de la chromatine est le sujet d'étude de nombreuses équipes comme celles de T. Kouzarides. L'étude de ces modifications est très importante dans le domaine de la régulation de la chromatine car augmentent considérablement la complexité du code des histones (pour revue (Rothbart and Strahl, 2014)).

1.1.3 Les complexes de remodelage de la chromatine ATP-dépendants

Famille	Complexe	Sous-unité ATPase
SWI/SNF	SWI/SNF	BRM/BRG1
	RSC	
CHD	CHD	Chd1/2, 5 à 9
	Mi-2/NuRD	Chd3/4
ISWI	NURF	SNF2L
	CHRAC	SNF2H
	ACF	
	NoRC	
	RSF	
	WICH	
INO80	INO80	INO80
	SRCAP	SRCAP
	TIP60/NuA4	EP400

Tableau 1.3: Complexes de remodelage de la chromatine chez l'humain. Familles, complexes et leurs sous-unités à activité ATPase. (Adapté de (Clapier and Cairns, 2009) ; (Langst and Manelyte, 2015)). ATRX est une protéine de remodelage ATP-dépendant proche de la famille des CHD qui interagit également avec des chaperons d'histones.

Par définition, les complexes de remodelage de la chromatine déstabilisent les contacts ADN-histones au sein des nucléosomes afin d'augmenter l'accessibilité de l'ADN et la mobilité des

nucléosomes (Gangaraju and Bartholomew, 2007). Ils sont donc responsables de la réorganisation de la chromatine via le déplacement des nucléosomes ou leur éviction. Ce sont des complexes multiprotéiques qui ont la particularité d'hydrolyser de l'ATP pour exercer leur activité translocase de l'ADN. Ils contiennent 2 à 20 sous-unités, comprenant une sous-unité catalytique à activité ATPase et des domaines de lecture de la chromatine qui assurent sa régulation. Ceci leur permet de réguler la disponibilité de séquences régulatrices de l'ADN comme les *enhancers*, promoteurs ou origines de réplication. Ainsi l'accessibilité de régions régulatrices pouvant être enfouies dans la structure du nucléosome se retrouvent disponibles au niveau du *linker*. Ils peuvent également changer la composition de la chromatine en terme de variant d'histones par l'éjection ou l'échange de dimères. Il existe 4 familles de complexes de remodelage impliqués dans des contextes biologiques spécifiques selon leurs caractéristiques (voir tableau 1.3).

Les complexes de la famille SWI/SNF jouent un rôle dans l'activation et l'élongation de la transcription, la réplication et la réparation. Leur enzyme a la particularité de contenir un bromodomaine en C-terminal et un domaine HSA N-terminal.

Les complexes ISWI possèdent souvent un domaine de liaison à l'ADN et ont un rôle dans l'espacement des nucléosomes au cours de la répression ou l'activation de la transcription. Les enzymes SNF2L/H contiennent un domaine ATPase en C-terminal ainsi qu'un domaine SANT (*Swi3*, *Ada2*, *N-Cor* & *TFIIB*) et un domaine SLIDE (*SANT-like ISWI domain*) qui lie la queue d'H4 non-modifiée.

Les enzymes de la famille CHD (*chromodomain, helicase, DNA binding*) ont la particularité de contenir 2 chromodomaines en N-terminal (Murawska and Brehm, 2011). Des domaines additionnels définissent 3 sous-familles de complexes CHD. La première sous-famille comprend CHD1 qui contient un domaine de liaison à l'ADN en C-terminal. Les protéines CHD5 à 9 sont diverses et possèdent des domaines fonctionnels additionnels de type SANT. CHD3 et 4 contiennent un domaine PHD en N-terminal. Le complexe NuRD a la particularité de contenir également une activité déacétylase via HDAC1/2 et permettrait la compaction de l'hétérochromatine (Denslow and Wade, 2007). Il jouerait un rôle dans la répression de la transcription et la réparation (voir partie 3).

Enfin, la famille INO80 nous intéresse particulièrement puisqu'elle contient TIP60 et sa sous-unité ATPase EP400. Les complexes de cette famille contiennent plus de 10 sous-unités dont des protéines associées à l'actine (ARP) et les protéines RUVBL1/2. De plus, l'ATPase possède un domaine catalytique divisé en 2 parties, et cette insertion contient notamment le domaine de liaison des protéines RUVBL. Chez la levure, cette famille comprend INO80 et SWR1. La protéine de remodelage Swr1 et le complexe acétyltransférase NuA4, qui sont séparés chez *S. cerevisiae*, ont fusionné au cours de

l'évolution pour former un seul grand complexe chez l'humain : le complexe TIP60 (Auger et al., 2008). La fonction de SWR1 chez la levure est ainsi assurée par SRCAP et TIP60 chez l'humain.

Le complexe INO80 contient 13 sous-unités conservées de la levure à l'humain (Jin et al., 2005). Sa sous-unité catalytique est Ino80, et 3 de ses sous-unités sont partagées avec TIP60 (voir tableau 1.3). Il joue une fonction clé dans la transcription, la réplication et la DDR. Il est recruté précocement aux CDBs ainsi que plus tardivement (voir partie 3).

Le complexe SRCAP contient 10 sous-unités dont 6 communes avec TIP60. La protéine à activité ATPase Srcap possède une série de domaines de type "crochet A/T" en C-terminal. Le complexe interagit avec CBP aux promoteurs de gènes et jouerait un rôle dans la transcription (Monroy et al., 2001). De plus, comme mentionné précédemment, le complexe SRCAP partage avec TIP60 la fonction d'incorporation de H2AZ dans la chromatine qui est assurée par SWR1 chez la levure. La composition et la fonction de TIP60 seront discutées en partie 2. Le rôle des complexes de remodelage de la chromatine au cours de la DDR sera décrit en partie 3.

1.1.4 Les chaperons d'histones

Les chaperons d'histones sont des protéines sans activité enzymatique qui interagissent avec les histones et régulent leur incorporation dans la chromatine. Les histones doivent être prises en charge par des chaperons pour 1) leur translocation du cytoplasme vers le noyau et ainsi réguler leur disponibilité nucléaire, 2) être activement incorporées ou enlevées de la chromatine lors de la transcription, lors du passage de la fourche de réplication et de la réparation. De plus, on distingue globalement 2 familles de chaperons, celles qui sont spécifiques des dimères H2A-H2B et celles de H3-H4 (voir tableau 1.4). Certains chaperons sont spécifiques de variants, et cette spécificité serait contrôlée par les domaines ou résidus particuliers des variants. Par exemple HJURP interagit avec CENPA via le domaine CATD (CENP-A targeting domain) spécifique du variant de H3 (Bassett et al., 2012).

Lors de la réplication, l'ADN polymérase va recopier l'ADN et conduire au doublement du matériel génétique. Le complexe de réplication va déstabiliser les nucléosomes en avant de la fourche et les dimères et /ou tétramères sont pris en charge par des chaperons. Il faut ensuite restaurer la chromatine après le passage de la fourche et les histones parentales vont être recyclées en même temps que des histones nouvellement synthétisées vont être incorporées. Dans un premier temps, les histones sont prises en charge par ASF1 (H3-H4) et FACT (H2A-H2B). Après le passage de la fourche, les anciennes histones sont recyclées via ASF1 avec le complexe MCM2-7 sur le brin matrice et celui

nouvellement synthétisé. De plus, les nouvelles histones sont fournies par ASF1 qui transmet à CAF1 les dimères H3.1/2-H4 en collaboration avec le facteur de processivité PCNA. D'autre part, HIRA peut participer à l'incorporation de dimères H3.3-H4. Finalement, FACT et NAP1 apportent les dimères H2A-H2B. La rapidité de la fourche est garantie par la disponibilité et la dynamique des chaperons et de leurs co-facteurs comme PCNA par exemple (Gurard-Levin et al., 2014).

H3-H4

chaperon	Spécificité	Fonction
CAF1	H3.1/2	réplication, réparation
HIRA	H3.3	NFR, transcription
DAXX	H3.3	téломères, centromères
HJURP	CENPA	centromères
ASF1	H3.1/2	réservoir
NASP	H3	transit

H2A-H2B

chaperon	Spécificité	Fonction
FACT	H2A/X	réparation
ANP32E, YL1	H2AZ	transcription, réparation?
APLF	macroH2A	réparation, transcription
nucleolin	macroH2A	transcription
NAP1	H2A/H2AZ	aussi H3-H4?
NPM/nucleoplasmin	H2A	

Tableau 1.4: Chaperons d'histones, spécificité et fonctions chez l'humain. En haut, les chaperons spécifiques des dimères H3-H4; en bas ceux de H2A-H2B. En jaune, les protéines qui participent au stockage, au transit et à l'assemblage des nucléosomes; en bleu les facteurs qui régulent l'échange et le recyclage des histones dans la chromatine couplé à un aspect spécifique du métabolisme de l'ADN. Néanmoins, NAP1 semble capable d'interagir de façon non spécifique avec tous les types de dimères (adapté de (Gurard-Levin et al., 2014)).

Pendant la transcription, les histones doivent être enlevés lors du passage de l'ARN-polymérase II. C'est un processus complexe qui va nécessiter la collaboration de tous les facteurs de remodelage de la chromatine (PTMs comme H3K56ac, chaperon, remodelage ATP-dépendant). Des protéines adaptatrices vont interagir avec la machinerie de transcription. Certains chaperons vont être spécifiquement recrutés au niveau des promoteurs pour initier la transcription et ensuite pour restaurer la chromatine. Finalement, le rôle des chaperons lors de la réparation de l'ADN sera discuté en partie 3.

De part la structure du nucléosome, les dimères d'H2A-H2B sont plus labiles. Malgré la diversité des variants d'H2A peu de chaperons spécifiques ont été identifiés à ce jour. Il n'existe pas de chaperon

spécifique des variants d'H2B. FACT peut aussi prendre en charge H2AX/Z (Heo et al., 2008). APLF pourrait spécifiquement incorporer macroH2A (Mehrotra et al., 2011). Finalement on ne connaît à ce jour qu'un seul chaperon spécifique à l'incorporation de H2AZ: Chz1 chez la levure (Luk et al., 2007).

Chez les mammifères, ANP32E serait un chaperon de H2AZ impliqué dans son éviction de la chromatine. Elle a été récemment décrite comme interagissant avec le complexe TIP60 (Obri et al., 2014) mais cette interaction reste controversée (Mao et al., 2014). TIP60 et SRCAP sont responsables d'incorporer H2AZ au sein de la chromatine mais sa déposition de H2AZ reste encore mal comprise. Identifier et comprendre la régulation des différents chaperons est essentiel pour comprendre la dynamique des variants d'histones et leur fonction. La surexpression de certains chaperons a été reliée au cancer et d'autres pathologies humaines. L'étude des variants et de leur chaperon est donc indissociable.

Le complexe TIP60 se trouve au cœur de la dynamique chromatinienne et à l'interface de tous les acteurs de régulation de cette dynamique. Il possède notamment une activité de modification post-traductionnelle des histones, une activité de remodelage ATP-dépendante et régule l'incorporation du variant d'histone H2AZ. Enfin, il contient plusieurs domaines de lecture de marques épigénétiques qui le relient à de nombreuses fonctions cellulaires. Les caractéristiques de TIP60, sa composition, sa fonction et sa régulation vont être abordés dans la seconde partie du chapitre 1.

1.2 Le complexe TIP60/NuA4: un acteur essentiel de la dynamique chromatinienne

Un complexe multiprotéique est défini par un ensemble de protéines qui interagissent de manière stable et dont les interactions sont de nature hydrophobe. À l'opposé des interactions de nature transitoire sont basées sur des interactions électrostatiques et brisées par une augmentation de la concentration saline. Ceci implique qu'une élévation de la concentration de sels renforce l'interaction des différentes sous-unités et la stabilité du complexe considéré.

Le complexe TIP60 contient plus de 16 sous-unités et représente une plateforme multiprotéique de plus de 1,5 MDa (Doyon et al., 2004). Le rôle de TIP60 est essentiel et le complexe est considéré comme un régulateur clé de la fonction cellulaire. Il contient en effet 3 activités enzymatiques: de remodelage ATP-dépendant, hélicase et lysine-acétyl-transférase. Ses substrats comptent notamment des régulateurs clés de la chromatine (Sapountzi and Cote, 2011). De plus, TIP60 possède différents domaines de lecture de marques épigénétiques participant à son ciblage au sein de régions spécifiques du génome. Son importance fonctionnelle est illustrée par une très haute conservation au cours de l'évolution de la levure à l'humain.

1.2.1 Description et présentation des sous-unités du complexe

1.2.1.1 Généralités

TIP60 est l'homologue de NuA4 (*Nucleosome Acetyltransferase of H4*) chez la levure *S.cerevisiae* (figure 1.6 et tableau 1.5; (Doyon and Cote, 2004)). De ce fait, la caractérisation des sous-unités de TIP60 est largement inspirée des travaux effectués chez la levure. D'un point de vue évolutif, TIP60 correspond en fait à la fusion de 2 entités chez la levure: SWR1 et NuA4 (Auger et al., 2008). Le complexe comprend 13 sous-unités chez la levure et environ 16 sous-unités chez l'humain (Cai et al., 2003; Doyon et al., 2004; Ikura et al., 2000). Certaines sous-unités n'ont pas de correspondance dans les 2 complexes mais des liens fonctionnels ont été établis (notamment pour RUVBL1/2, BRD8). Chez la levure, NuA4 possède des sous-modules indépendants. De ce fait, EAF1 est la seule sous-unité unique au complexe. Par exemple, piccolo-NuA4 (Esa1, Epl1, Yng2 et EAF6) est une entité indépendante, défini comme le sous-complexe minimal requis pour l'activité acétyltransférase nucléosomale. Il est responsable de l'acétylation globale de la chromatine *in vivo* chez la levure mais n'existe pas à l'état natif chez l'humain (Boudreault et al., 2003; Doyon et al., 2004; Selleck et al., 2005). De plus, le trimère EAF5-EAF7-EAF3 (TINTIN pour *trimer independent on NuA4 for transcription interactions with nucleosomes*) semble jouer une fonction

indépendante durant l'élongation de la transcription (Bhat et al., 2015; Cheng and Cote, 2014; Rossetto et al., 2014). Finalement, NuA4 comme TIP60 partagent certaines sous-unités avec d'autres complexes de régulation de la chromatine.

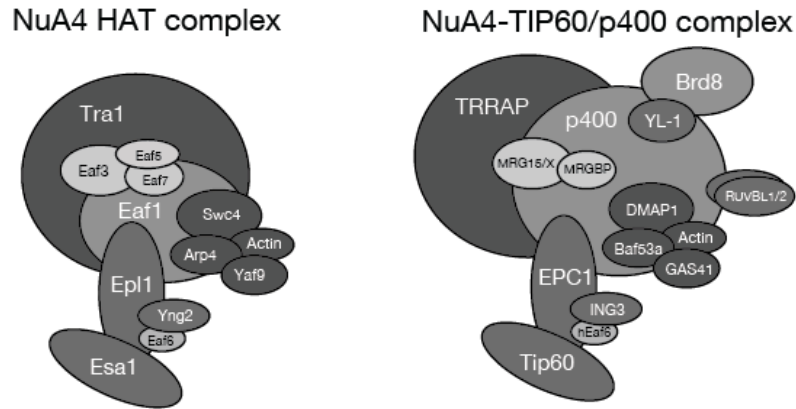


Figure 1.6: Les complexes NuA4 et TIP60 (Adapté de Rossetto et al., en préparation voir appendice 8).

La structure du complexe NuA4 a été résolue grâce à l'utilisation de méthodes de cryo-électromicroscopie et la conservation suggère une organisation et une stoechiométrie similaire pour TIP60 (Chittuluru et al., 2011). Les sous-unités uniques à TIP60 se trouvent dans le module piccolo-TIP60 : EPC1, ING3 et Tip60/KAT5. De plus il existerait des sous-complexes de TIP60 comme le complexe EP400 sans Tip60/KAT5, mais leur existence reste encore controversée (Fuchs et al., 2001). Un autre sous-complexe de TIP60 indépendant d'EP400 mais contenant TRRAP pourrait interagir avec MRN (Chailleux et al., 2010; Robert et al., 2006). Toutefois, les techniques employées et la nature même du complexe TIP60 pourraient expliquer ces résultats comme des biais expérimentaux, notamment à la lumière des observations structurales faites chez NuA4. Selon notre modèle, le complexe fonctionne comme une entité à part entière et ses différentes sous-unités ont une fonction régulatrice sur les activités enzymatiques à travers leur interaction avec des partenaires ou substrats. Toutefois il est extrêmement difficile de disséquer l'impact de chaque sous-unité sur la fonction globale de TIP60 d'autant plus si celles-ci sont partagées avec d'autres complexes.

Tableau 1.5: Présentation du complexe TIP60

Nom	Taille (kDa)	Activité enzymatique	Domaines: spécificité	Autres domaines	Paralogue / isoforme	Homologue (S.cerevisiae)	Commentaires; présence dans d'autres complexes
TRRAP (Transformation/transcription domain-associated protein)	400	-		PI3K, FAT, FATC		Tra1	Kinase inactive; sous-unité d'architecture; SAGA; PCAF; TFTC
EP400 (E1A-binding protein 400; hDomino)	344	ATPase		SANT, HSA, Q rich		Swr1+ EAF1	Sous-complexe EP400?
BRD8 (Bromodomain 8)	>150		BrD: H4ac		iso : double bromodomaine	BDF1 (EAF5: architecture)	Sous-complexe trimérique?
EPC1 (Enhancer of Polycomb)	93,4		Nterm: H2A	EpcA	P: EPC2	Epl1	u
Tip60 (Tat Interacting Protein 60kDa) /KAT5/PLIP	55	Acétyl-transférase	CHD : H3K4me1 (H3K9me3, K36me3, K4me?)	MYST	iso: 4 identifiés	Esa1	suppresseur de tumeur; u
ING3 (Inhibitor of Growth Protein 3)	46		PHD: H3K4me3			Yng2	suppresseur de tumeur; u
DMAP1 (Dnmt1 associated Protein 1)	53	?		SANT		EAF2/Swc4	SRCAP
RUVBL1/2 (Tip49/48, Reptin/Pontin)	49	Hélicase Walker A/B					INO80; SRCAP; H2AZ?
BAF53a (53kDa BRG1-Associated Factor)	53			Actin related		ARP4	INO80; SRCAP
VPS72 (Vacuolar Protein sorting-associated protein 72 homolog)/ YL1	40,5					Swc2	Chaperon de H2AZ; SRCAP
Actin	41,7					Act1	SRCAP
MRG15 (MORF Related gene 15) /MORF4L1	41		CHD: H3K36me2/3	MRG: H2Bubi?	P: MRGX; iso:variant CHD	EAF3	Sin3B/Rpd3S; PALB2; MOF
MRGX (MORF Related gene X) / MORF4L2	32,3			MRG	P: MRG15		PALB2
MRGBP (MRG Binding Protein) /C20orf20	30					EAF7	Sous-unité d'architecture
YEATS4 / GAS41	26		YEAST: H3/H4ac			Yaf9	SRCAP
MEAF6	22					EAF6	HBO1, MOZ/MORF

p : paralogue; iso : isoforme; u : sous-unité unique.

1.2.2 Les activités enzymatiques au sein du complexe

1.2.2.1 Activité acétyl-transférase par Tip60/KAT5

Tip60 (*HIV Tat interacting protein 60kDa*) ou KAT5 est l'homologue d'Esa1 (*Essential Sas family acetyltransferase 1*) chez la levure et toutes les 2 sont essentielles. Le KO de Tip60 est létal embryonnaire au stade blastocyste (Hu et al., 2009). Tip60/KAT5 est un gène suppresseur de tumeur haplo-insuffisant

fréquemment muté dans les cellules cancéreuses (Gorrini et al., 2007; Mattera et al., 2010). Son expression est ubiquitaire et globalement faible et serait notamment régulée par ubiquitylation et dégradation par le protéasome via la voie Mdm2 en réponse aux UVs (Legube et al., 2002). Il existe 4 isoformes d'épissage identifiés à ce jour dont les fonctions différentielles demeurent encore inconnues (Legube and Trouche, 2003). Tip60 β (ou PLIP) est l'isoforme le plus proche d'Esa1 et semble jouer une fonction similaire à Tip60 α , qui est considéré comme l'isoforme canonique (Doyon et al., 2004). La localisation de Tip60 est essentiellement nucléaire mais la protéine aurait aussi été détectée dans le cytoplasme (Muckova et al., 2006). Notamment, une interaction avec le récepteur membranaire IL-9R pourrait exister (Sliva et al., 1999) et sa présence au niveau péri-nucléaire a été reportée (Lee et al., 2001).

Tip60 possède un domaine catalytique MYST en C-terminal conservé dans la famille des KAT du même nom. Ce domaine contient une séquence de liaison de l'AcoA et un domaine à doigt de Zinc (Marmorstein, 2001). Tip60 possède également une *NR box* en C-terminal responsable de l'interaction avec des récepteurs nucléaires. Le mécanisme d'autoacétylation d'Esa1, Sas2 et Mof est à la base de leur fonctionnement enzymatique (Yuan et al., 2012). Chez les MYST comme Tip60, le groupement acétyle est transféré sur l'enzyme au niveau de plusieurs résidus du domaine catalytique avant d'être transféré sur le substrat (Yang et al., 2012). De plus, des sites d'acétylation conservés chez Tip60 ont été identifiés au sein du domaine MYST dans un KO de SIRT1 chez la souris (Peng et al., 2012). Finalement, Tip60 possède aussi un domaine de lecture de la chromatine de type chromodomaine (Vakoc et al., 2006) en N-terminal (voir partie 2-1.2.3.1).

1.2.2.2 Activités hélicase/ ATPase par RUVBL1 et RUVBL2

RUVBL1 et 2 appartiennent à la famille des AAA+ (*ATPase Associated with various cellular functions*). Elles présentent 43% d'identité de séquence et sont homologues à l'hélicase et ATPase dépendante de l'ADN RuvB chez la bactérie (Putnam et al., 2001; Yamada et al., 2001). Elles possèdent des domaines Walker A et B typiques des ATPases en N- et C-terminal et un domaine ATPase central. Elles s'organisent sous forme d'hexamères contenant les deux homologues, ou de dodécamères soit 2 hétéro-hexamères en forme d'anneau (Gorynia et al., 2011). Elles appartiennent à plusieurs complexes multiprotéiques dont INO80, SRCAP et TIP60 au sein desquels elles sont sur-stœchiométriques (Doyon and Cote, 2004; Gallant, 2007). Elles seraient aussi retrouvées indépendamment de ces complexes et sont surexprimées dans certains cancers (Grigoletto et al., 2011).

Il existe une controverse concernant leurs activités enzymatiques (Ikura et al., 2000) mais des études suggèrent que leurs activités hélicases seraient opposées 5'-3' vs 3'-5' (Kanemaki et al., 1999) et que la présence d'ADN stimulerait leur activité ATPase (Gorynia et al., 2011). Elles ne sont pas présentes dans le complexe de levure NuA4 mais sont présentes dans le complexe SWR1.

1.2.2.3 Activité de remodelage dépendant de l'ATP par EP400

EP400 est l'homologue de Domino chez la drosophile. Domino est essentielle à la prolifération et à la régulation de la transcription (Ruhf et al., 2001). De plus, EP400 est la fusion de Swr1 et EAF1 chez la levure (Auger et al., 2008). EAF1 est la seule sous-unité unique à NuA4. Sa délétion rend les cellules sensibles à la rapamycine et aux drogues induisant des dommages de l'ADN, reflétant le rôle de NuA4 dans la transcription des gènes ribosomiaux et la réparation des CDBs respectivement. Il joue un rôle dans l'incorporation de H2AZ au promoteur des gènes de la biosynthèse des purines (Cheng et al., 2015). L'acétylation de la chromatine par NuA4 régule l'incorporation de Htz1 par SWR1 (Altaf et al., 2010). EAF1 est aussi impliquée dans le point de contrôle du cycle cellulaire à la transition G2/M.

EP400 et EAF1 sont des homologues structuraux au sein des complexes mais sont différents en terme de séquence/protéine. Particulièrement, EP400 possède dans sa région centrale un domaine ATPase de type SWI2/SNF2 (1051-1625) qui lui est propre et qui est responsable de son activité enzymatique. Ce domaine participe aussi à la liaison des protéines RUVBL1/2 au reste du complexe. En ce sens, il est plus proche de Swr1 qui interagit aussi avec les hélicases RUVBL1/2. Par contre, il possède plusieurs domaines aussi retrouvés dans EAF1: un domaine SANT (Swi3-Ada2-N-Cor-TFIIB), HSA (*Helicase/SANT-Associated*), un domaine Q-rich en C-terminal et un domaine chargé conservé adjacent au domaine HSA (Auger et al., 2008). Le domaine SANT de EP400 lie potentiellement les queues d'histone, l'ADN ou d'autres protéines (Boyer et al., 2004). Celui de EAF1 relie notamment Tra1 au reste du complexe.

EP400 a été originellement identifié comme étant un partenaire de la protéine E1A impliquée dans la réplication de l'adénovirus et la transformation cellulaire (Fuchs et al., 2001). C'est une protéine à activité ATPase possédant une fonction de remodelage de la chromatine, responsable de l'incorporation de H2AZ *in vivo et in vitro*, en faisant un régulateur important de la transcription (Gevry et al., 2009). Son activité d'échange de H2AZ semble importante pour la régulation de l'expression des gènes (Venkatesh and Workman, 2014)

EP400 au sein de TIP60 joue un rôle important dans la réparation ((Xu et al., 2010); voir partie 3). De plus, EP400 jouerait un rôle particulier dans la régulation de l'homéostasie des espèces réactives

de l'oxygène (Mattera et al., 2010). Bien qu'EP400 soit considérée comme une sous-unité stable et unique à TIP60, un sous-complexe a été décrit qui ne contiendrait pas la protéine Tip60/KAT5 et qui jouerait un rôle de répresseur de la fonction de TIP60 (Fuchs et al., 2001; Park et al., 2010). Notamment, EP400 réprimerait la transcription de p21 en conditions normales (Legube et al., 2002).

1.2.3 Les domaines de lecture de la chromatine

1.2.3.1 *Chromodomaine de Tip60/KAT5*

Tip60/KAT5 possède également un domaine de lecture de la chromatine en N-terminal de structure similaire à son homologue Esa1. Initialement identifié comme un CHD, il a été proposé qu'Esa1 posséderait un domaine de type Tudor ou chromobarrel dû à la présence en N-terminal d'une extension (ou noeud) (Huang and Tan, 2013; Shimojo et al., 2008). Le domaine ne semble pas impliqué dans la reconnaissance de marques (Selleck et al., 2005) et serait spécifique de la queue non-modifiée d'H3 (Jacobs et al., 2001). De plus, la liaison du domaine à la chromatine semble impacter l'activité HAT, puisque des mutants ponctuels ont une perte d'activité. Ceci pourrait aussi avoir un effet sur le repliement du domaine catalytique MYST. Cet effet a aussi été observé pour Tip60 (Sun et al., 2009).

Le CHD de Tip60 serait spécifique de H3K4me1 et jouerait un rôle dans la liaison du complexe aux *enhancers* pour l'activation de la transcription. Ceci passerait par l'acétylation de la chromatine et notamment H2AK5ac (Jeong et al., 2011). Une autre étude a montré une interaction spécifique *in vitro* du CHD avec H3K9me3 (Sun et al., 2009). Les cellules double KO Suv39H1/H2 semblent montrer une perte d'activité de Tip60 *in vitro* après purification. De plus, les auteurs argumentent que la liaison de H3K9me3 participerait au ciblage du complexe à l'hétérochromatine notamment pendant la réparation des CDBs (partie 3). Ils observent aussi une interaction avec H3K36me3. Enfin, une dernière étude observerait une interaction du CHD avec H3K4me3 qui ciblerait le complexe au promoteur de gènes (Kim et al., 2015). De plus, le CHD de Tip60 serait capable d'interagir avec les acides nucléiques aussi bien l'ARN (Shimojo et al., 2008) que l'ADN (Huang and Tan, 2013). Récemment, un lien entre les R-loops et le complexe TIP60 a été établi (Chen et al., 2015). Les R-loops sont des structures hybrides constituées de l'ADN matrice et d'ARN provenant des transcrits naissants pendant la transcription au niveau des promoteurs. La présence de TIP60 au promoteur de gènes semble dépendante de la formation des R-loops, suggérant en fait que le CHD de Tip60 pourrait participer au ciblage du complexe TIP60 à travers la liaison de ces structures. Il existe donc une importante controverse concernant la spécificité de ce domaine.

Tip60 est le substrat de nombreuses PTM au sein de ses domaines fonctionnels et de façon intéressante au sein même de son CHD. La phosphorylation de Tip60 dans son CHD sur la tyrosine 44 par C-Abl semble affecter sa liaison à H3K9me3 (Kaidi and Jackson, 2013). De plus, le CHD est aussi acétylé sur plusieurs résidus sous la dépendance de SIRT1 (Peng et al., 2012). *L'acétylation dans le CHD sur un résidu conservé chez Esa1 est à l'origine d'un projet annexe que j'ai mené lors de mon doctorat (voir chapitre 4).*

1.2.3.2 Domaines CHD et MRG des protéines MRG15 et MRGX

MRG15 appartient à la famille des protéines à domaine MRG (*Morf related gene*) qui contient MRGX, MRG15 et MRGBP. Le domaine MRG est hautement conservé et ces protéines présentent environ 96% d'identité de séquence pour ce domaine (Bowman et al., 2006). MRG15 est la seule à posséder un domaine de lecture de type CHD. De façon intéressante, il existe 2 isoformes d'épissage dont l'un d'eux présente une insertion au sein de ce même domaine. Cet isoforme minoritaire plus long ressemble plus à l'homologue EAF3 chez la levure.

La spécificité d'EAF3 a été clairement établie pour H3K36me2/3 (Carrozza et al., 2005b; Joshi and Struhl, 2005; Keogh et al., 2005). Sa fonction de ciblage à la chromatine a été démontrée au sein du complexe Rpd3S au niveau du corps des gènes transcrits et en lien avec la régulation de la transcription cryptique (Carrozza et al., 2005b; Keogh et al., 2005; Li et al., 2007). Le CHD de MRG15 reconnaît H3K36me2/3 de la même manière et participe au ciblage de TIP60 et Sin3B à la chromatine (Hayakawa et al., 2007; Kumar et al., 2012; Zhang et al., 2006). De plus, MRG15 a également été retrouvée dans le complexe MAF2 associé à MOF (Pardo et al., 2002).

MRGX est le paralogue de MRG15 mais ne contient pas de domaine CHD. Les 2 protéines semblent former des complexes TIP60 distincts (Hayakawa et al., 2007). Elles sont toutes les deux présentes retrouvée dans Sin3B, l'homologue de Rpd3S. MRG15 oscillerait donc entre 2 fonctions opposées d'activation et d'inhibition de la transcription à travers ces 2 complexes. Le domaine MRG de MRG15 est responsable de la liaison de Pf1, la reliant au complexe Sin3B (Kumar et al., 2012). Il serait également structurellement homologue à un domaine de liaison à l'ADN, mais cette fonction n'a pas été démontrée expérimentalement (Bowman et al., 2006). Finalement, le domaine MRG de MRG15 serait aussi capable de lier H2BK119ubi ce qui ciblerait l'acétylation de H4K16 durant la réparation par recombinaison homologue ((Wu et al., 2011); voir partie 2 et 3). *La dynamique de MRGX vs MRG15 au*

sein du complexe TIP60 et les fonctions différentielles de ces 2 protéines sont à l'origine d'un projet qui ne sera pas présenté ici.

1.2.3.3 Bromodomaine de BRD8

Bdf1 est l'homologue de BRD8 et possède 2 bromodomains qui reconnaissent H4 acétylée. Il participe à la fonction d'échange de H2AZ par le complexe SWR1 et au recrutement du facteur de transcription TFIID au niveau des promoteurs (Altaf et al., 2010; Ladurner et al., 2003; Matangkasombut et al., 2000). De plus, Bdf1 n'est pas stoechiométrique avec le reste de SWR1 et semble représenter un sous-complexe qui sans Bdf1 serait plus similaire à SRCAP. BRD8 n'a pas d'homologue dans NuA4 à proprement parler mais prend la place de EAF5 structurellement au sein du complexe. Toutefois, il existe une interaction génétique entre Esa1 et Bdf1 donc un lien fonctionnel évolutif conservé (Matangkasombut et al., 2000).

BRD8 possède 2 isoformes d'épissage contenant 1 ou 2 bromodomains qui pourraient avoir des fonctions différentes. Il est intéressant de noter que l'espacement entre les lysines acétylées dans certaines queues d'histones, comme celle de H4, est régulier. Cette disposition pourrait donc faire partie d'un motif de reconnaissance. En effet, beaucoup de protéines à bromodomaine comme TAFII250 contiennent des BRD adjacents qui pourraient en fait fonctionner de façon synergique (Strahl and Allis, 2000). Le variant court ou p120 a été montré pour interagir avec les récepteurs TR (*thyroid receptor*) et RXR (*9-cis-retinoic acid receptor*) et les activer (Monden et al.). On peut donc penser que les 2 isoformes de BRD8 pourraient avoir des rôles différentiels au sein du complexe TIP60.

1.2.3.4 PHD d'ING3

ING3 fait partie de la famille des protéines ING (*Inhibitor of Growth*) qui compte 5 membres (pour revue (Avvakumov and Cote, 2007; Tallen and Riabowol, 2014)). Les protéines ING sont des suppresseurs de tumeurs présents dans les complexes de la famille MYST (Doyon et al., 2006). ING3 est le plus divergent de la famille des ING. C'est l'homologue d'Yng2 chez la levure et les 2 protéines présentent 48% de similarité de séquence au niveau des 2 domaines fonctionnels. Le domaine N-terminal est responsable de l'interaction d'Yng2 avec le reste du complexe NuA4. Le domaine C-terminal contient un domaine PHD spécifique à H3K4me3 nécessaire à l'acétylation de la chromatine par NuA4 (Boudreault et al., 2003). De plus, le domaine C-terminal d'Yng2 serait capable d'interagir avec les phosphatidylinositol-phosphates ou PIP (Steunou, Cramet et al en préparation). Son homologue ING3 est une sous-unité unique au

complexe TIP60 et semble aussi jouer un rôle majeur dans le ciblage du complexe. Elle participe notamment à la régulation de la transcription dépendante de la voie p53, l'activation de l'apoptose en réponse à des dommages de l'ADN (Luo et al., 2009; Wang and Li, 2006) et l'arrêt du cycle cellulaire dépendant de p53 (Nagashima et al., 2003).

1.2.3.5 Les autres domaines fonctionnels au sein du complexe: TRRAP, DMAP1, YL1/VPS72, EPC1

TRRAP est la plus imposante sous-unité du complexe TIP60. Elle appartient à la famille des PIKK (*PI3K related kinases*) qui comprend ATM, ATR, mTor et DNA-PKcs (voir partie 3). Contrairement aux autres membres, elle ne possède pas d'activité kinase car son domaine kinase serait dépourvu des résidus essentiels au domaine catalytique (McMahon et al., 1998). Cette absence d'activité a été confirmée *in vitro* via des essais biochimiques (Saleh et al., 1998). C'est aussi une sous-unité des complexes SAGA et PCAF où elle joue également un rôle structural important. TRRAP est essentielle à la cellule et fonctionne comme un co-régulateur transcriptionnel (Murr et al., 2006).

TRRAP et son homologue chez la levure Tra1 sont structurellement très proches (Knutson and Hahn, 2011). Les 2 protéines contiennent des domaines FAT (*Focal Adhesion kinase Targeting*), FRB (*FKBP12 Rapamycin Binding*) et FATC (*FAT C-terminal*) qui sont des domaines d'interaction protéiques. Leur domaine FAT a une structure en hélice formée d'une cinquantaine de répétitions de type HEAT (*Huntingtin, elongation factor 3, PR65/A and TOR*) et une quinzaine de TPR (*tetratricopeptid*) et recouvre plus de la moitié amino-terminale de la protéine. Le domaine FBR adjacent au domaine PI3K est formé de 4 hélices anti-parallèles de type *coiled coil*. Le domaine FATC est un petit domaine formé de 2 hélices- α reliées par un pont disulfure. Les domaines PI3K, FATC et FRB sont indispensables à sa fonction. TRRAP ne contient pas de domaine liant directement la chromatine. Cependant TRRAP interagit avec de nombreux partenaires comme Myc pendant la transcription ou le complexe MRN pendant la réparation (Chailleux et al., 2010; Park et al., 2001; Robert et al., 2006).

DMAP1 (*DNA methyltransferase 1-associated protein 1*) a été initialement identifiée comme étant associé à DNMT1 et à HDAC2 pour réprimer la transcription au cours de la réplication (Rountree et al., 2000). Elle est aussi retrouvée au sein du complexe SRCAP (Ruhl et al., 2006). DMAP1 possède un potentiel domaine de lecture de queue d'histones de type SANT (Boyer et al., 2004). Son homologue chez la levure, Eaf2 (ou Swc4) est essentiel et également retrouvé au sein du complexe SWR1. La fonction de son domaine SANT est cruciale puisque l'expression du domaine SANT rétablit la viabilité

dans un *Δleaf2* (Auger et al., 2008). Un siRNA dirigé contre DMAP1 induit des cassures double-brin spontanées de l'ADN et une activation du point de contrôle du cycle dépendant de p53 (Negishi et al., 2009). Il jouerait un rôle dans la régulation des points de contrôle du cycle cellulaire, la réparation de l'ADN et l'activation de l'apoptose.

YL1/Vps72 est l'homologue de Swc2 chez la levure. Swc2 est connue pour interagir directement avec Htz1 au sein de SWR1 (Wu et al., 2005). Chez l'humain, YL1 est aussi retrouvée dans TIP60 et SRCAP et aurait la même fonction de liaison à H2AZ (Cai et al., 2005; Latrick et al., 2016). La protéine possède un domaine acide en N-terminal et un domaine riche en proline en carboxy-terminal. La sur-expression de YL1 a un effet suppresseur de tumeur sur les cellules infectées par un virus, mais sa fonction serait liée à la transformation cellulaire indépendamment de la croissance (Horikawa et al., 1995).

YEATS4 est l'homologue de Yaf9 chez la levure. Yaf9 interagirait directement avec Swc4 (EAF2) via son domaine *coiled-coil* C-terminal et le rattacherait au reste du complexe NuA4 (Cairns et al 2005). De plus, un mutant de Yaf9 perdant l'interaction avec Swc4 phénocopie la délétion de *yaf9* lors du traitement à certaines drogues comme les inhibiteurs des microtubules (Le Masson et al., 2003). Yaf9 est impliqué dans l'acétylation d'H4, l'expression des gènes et l'incorporation de Htz1 aux télomères à travers SWR1 et NuA4 (Wang et al., 2009; Zhang et al., 2004). YEATS4 contient un domaine YEAST en N-terminal qui aurait la fonction de lier H4 ou H3 acétylés comme cela a été démontré pour son homologue AF9 (YEATS3) envers H3ac (Li et al., 2014; Schulze et al., 2009). Ce même domaine interagirait également avec le facteur de transcription TFIIF (Heisel et al., 2010). YEATS4 ou GAS41 (*Glioma-amplified sequence 41*) est surexprimée dans certains cancers comme les gliomes (Schmitt et al., 2012).

EPC1 (*Enhancer of Polycomb 1*) interagit avec la queue N-terminale de H2A via son domaine amino-terminale. Ainsi, l'étude de l'interaction de piccolo-NuA4 avec la chromatine a révélé qu'Epl1, l'homologue d'EPC1, joue un rôle essentiel dans le ciblage et l'interaction avec le nucléosome (Chittuluru et al., 2011). De manière intéressante, la délétion de la queue N-terminale de H2A bloque l'acétylation de la chromatine par NuA4 (Huang and Tan, 2013). Plus précisément, les résidus 51 à 72 d'Epl1 sont nécessaires pour l'interaction *in vitro*. Ceci a été confirmé avec EPC1 où la délétion d'un domaine N-terminal de 13 acides aminés bloque spécifiquement l'acétylation de H4 par piccolo-TIP60 (Lalonde et al.). Ce domaine serait donc impliqué dans la présentation du substrat au complexe pour le ciblage de

H4. H2A ne semble pas affectée ce qui suggérerait que son acétylation est régulée à travers une autre sous-unité et/ou une autre interaction avec la chromatine. EPC1 possède un paralogue EPC2 qui est retrouvé dans le complexe TIP60 mais dont la fonction semble reste indéterminée (Doyon and Cote, 2004). Les 2 protéines sont très proches et diffèrent seulement sur leur extrémité C-terminale. On s'attend donc à ce qu'EPC2 interagisse avec H2A de manière similaire. On ne sait pas si les 2 paralogues ont des fonctions différentes mais une étude montre que les 2 protéines ont une fonction similaire dans l'oncogénèse des leucémies myéloïdes aiguës (Huang et al., 2014b).

1.2.4 Les substrats du complexe TIP60

Les substrats de TIP60 doivent être absolument définis dans un contexte de complexe. Par exemple, Esa1 et Tip60 ne peuvent pas acétyler la chromatine seuls dans des essais *in vitro* (Allard et al., 1999). L'activité HAT est augmentée lorsqu'Esa1 est associé à Epl1 et l'ajout d'Yng2 dirige l'activité vers la chromatine et non les histones libres (Boudreault et al.). Ceci illustre le fait que la définition de substrat doit se faire avec précaution d'autant plus qu'*in vivo* la chromatine est liée par des facteurs très nombreux et donc dans un contexte beaucoup plus complexe. C'est également le cas pour les autres KATs en complexes multiprotéiques.

Les complexes NuA4 et TIP60 ont une activité différentielle sur les histones libres ou la chromatine native *in vitro*. En effet, TIP60 peut acétyler H3 sur les histones libres ce qui n'est pas le cas dans la chromatine *in vitro*. Plus particulièrement, TIP60 acétyle principalement H4 sur K5-8-12 et H2A sur K5 *in vivo* ((Doyon and Cote) ; figure 1.7). Ceci illustre encore une fois l'importance du contexte de complexe et de présentation des substrats à l'enzyme à travers un complexe multiprotéique. Cependant, il est possible que TIP60 possède d'autres substrats chromatiniens. L'acétylation de la lysine 16 sur H4 par TIP60 reste encore discutée mais pourrait être catalysée spécifiquement à la cassure double-brin ((Doyon et al., 2004; Tang et al., 2013) ; voir partie 3). De plus, chez la levure NuA4 pourrait aussi acétyler H2AK9 tout comme son homologue chez *Tetrahymena thermophila* (Ohba et al., 1999). De plus, Esa1 au sein de piccolo-NuA4 ciblerait aussi H2A sur d'autres résidus comme K8 et K14 (Arnold et al., 2011).

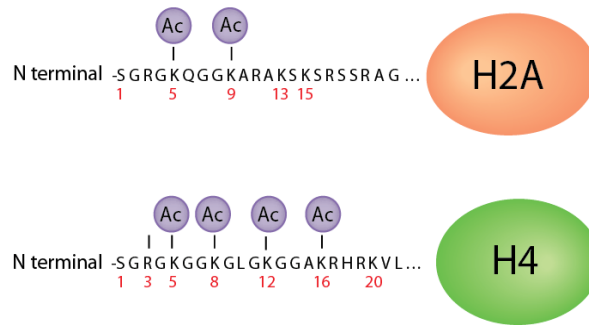


Figure 1.7: Résidus acétylés par TIP60 au sein de la chromatine *in vivo*. Les histones H4 (K5, 8 12 et potentiellement K16) et H2A (K5) sont spécifiquement acétylées par TIP60 au sein de la chromatine dans un contexte physiologique.

TIP60 acétyle la chromatine ainsi que de nombreux substrats non-histones comme des facteurs de transcription ou des régulateurs de la chromatine (Sapountzi and Cote, 2011). Le complexe TIP60 a été impliqué dans la régulation de suppresseurs de tumeurs et des oncogènes clés de la cellule. Ses cibles comptent notamment des facteurs des voies p53, Rb, NFκB, Notch and Myc ((Baek et al., 2002; Gorrini et al., 2007; Kim et al., 2007b; Tang et al., 2006); voir figure 1.8). L'exemple le plus connu est p53 dont l'acétylation favoriserait son ciblage à certains promoteurs (Sykes et al., 2006). L'acétylation sur la lysine 120 bloquerait sa liaison à l'ADN et la transcription de PUMA (Tang et al., 2006; Tyteca et al., 2006). De plus, TIP60 activerait la transcription de p21 par p53 en condition de stress. TIP60 régulerait aussi directement la transcription basale de p53 en conditions normales (Nagashima et al., 2003). D'autre part, TIP60 ciblerait Notch1 et serait un inhibiteur de la voie en réponse aux UV (Kim et al., 2007b). TIP60 serait aussi un régulateur de la stabilité de c-Myc (Patel et al., 2004). La liste des substrats de TIP60 est non exhaustive mais suggère que TIP60 serait impliqué dans la régulation du cycle cellulaire, la sénescence, la prolifération et l'apoptose (Chan et al., 2005; Chen et al., 2013b; Legube et al., 2004).

De plus, des sites potentiels d'acétylation ont été identifiés sur Tip60 au sein du domaine MYST et du chromodomaine qui joueraient un rôle dans la réparation de l'ADN notamment (Peng et al., 2012; Yang et al., 2012; Yuan et al., 2012). En dehors de l'enzyme, l'acétylation de 5 sous-unités du complexe incluant ING3, BRD8, MEAF6, EP400 et EPC1 est significativement augmentée dans un KO pour la déacétylase SIRT1 (Chen et al., 2012b). De plus, RUVBL1/2, TRRAP, DMAP1 et MRG15 sont acétylées *in vivo* (Choudhary et al., 2009; Kim and Yang, 2011). Par rapport à ce qui est connu pour les KATs, le

mécanisme d'auto-acétylation n'est pas limité à l'enzyme. Toutes les sous-unités de TIP60 sont donc des substrats potentiels et l'acétylation pourrait jouer un rôle dans leur fonction.

1.2.5 Les fonctions du complexe TIP60

La fonction de TIP60 est étroitement liée à l'oncogenèse de par sa fonction de régulateur de la transcription et son rôle dans le maintien de la stabilité du génome. Il est impliqué notamment dans la régulation de gènes suppresseurs de tumeur et d'oncogènes clés comme p53, Rb, TWIST, PRAK ou NFκB ((Kim et al., 2005; Shi et al., 2014; Voss and Thomas, 2009; Zheng et al., 2013a); voir figure 1.8)

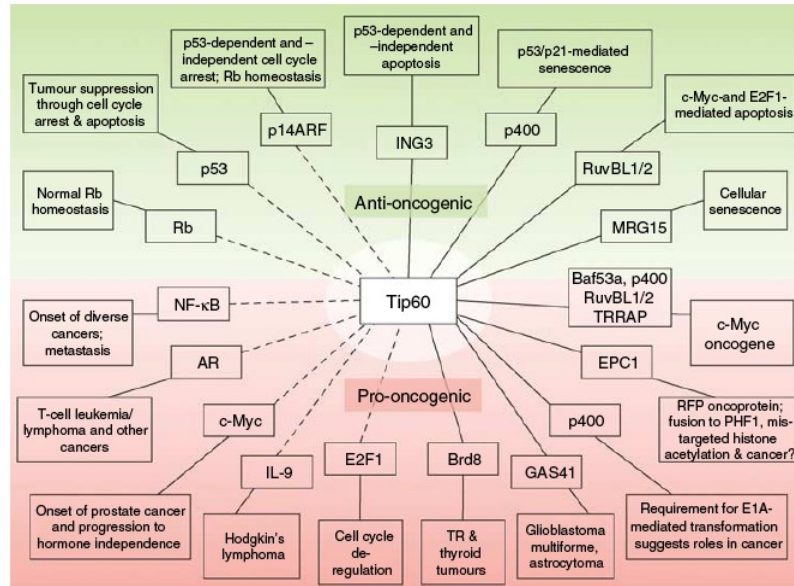


Figure 1.8: Connexions entre TIP60 et l'oncogenèse (adapté d'Avvakumov & Cote 2007).

1.2.6 Rôle pendant la transcription

On considère TIP60 comme un co-activateur de la transcription qui localise principalement aux promoteurs des gènes activement transcrits (Galarneau et al., 2000; Wang et al., 2009). En effet, plusieurs groupes ont étudié la localisation de Tip60/KAT5 à l'échelle du génome entier dans les cellules ES (Fazio et al., 2008) ou dans les cellules humaines primaires (cellules souches hématopoïétiques ; (Ravens et al., 2015; Wang et al., 2009)). TIP60 semble situé aux promoteurs de gènes et aux *enhancers* dans les cellules embryonnaires.

D'autre part, son activité acétyltransférase est généralement reliée à l'activation de la transcription. Chez la drosophile H3K4me3 stimule l'acétylation et l'échange de H2Av par TIP60 pour l'activation de la transcription (Kusch et al., 2014). NuA4 et SWR1 forment TIP60 et SRCAP chez l'humain qui remplissent tous les deux la fonction d'incorporation de H2AZ pour la régulation de la transcription. De plus, Tip60 semble colocaliser avec Myc aux promoteurs de gènes transcrits et serait recruté par celui-ci (Frank et al., 2003; Gorrini et al., 2007). De plus, E2F recruterait TIP60 pour l'acétylation de la chromatine et l'activation de la transcription (Taubert et al., 2004). On lui attribue notamment un rôle dans la transcription des gènes oestrogéno-régulés dans les cellules humaines où cette fonction nécessite la collaboration avec BRG1 (ATPase du complexe SWI/SNF) et MLL1 ((KMT2A de H3K4) ; (Brady et al., 1999; Jeong et al., 2011)).

Toutefois, on lui attribue aussi un rôle de co-répresseur de la transcription. TIP60 semble réguler l'identité cellulaire dans les ES via la répression des gènes de différenciation. Cette régulation est indépendante de l'acétylation d'H4 qui reste non-affectée (Fazio et al., 2008). Dans les cellules ES, HDAC6 et Tip60-EP400 co-purifient et colocalisent partiellement aux TSS (Chen et al., 2013b). De plus, la localisation de TIP60 aux promoteurs de gènes activement transcrits serait dépendante de la formation de R-loops (Chen et al., 2015). Les R-loops régulent négativement l'élongation de la transcription et sont observés au niveau des promoteurs "en pause" et aux sites de terminaison de la transcription. Ils peuvent aussi induire l'effondrement de la fourche de réplication et sont la source potentielle d'instabilité du génome. Dans les cellules ES, ils cibleraient spécifiquement TIP60 pour la régulation de la transcription et de la différenciation. De plus, une interaction avec le répresseur de la transcription ZEB a été décrite dans les cellules Jurkat (Hlubek et al., 2001). Dans l'hétérochromatine, Tip60 réprimerait l'expression des microsatellites péri-centromériques à travers BRD2 (Grezy et al., 2016). Un dernier exemple concerne TIP60 et la protéine virale E6 du HPV (Jha et al., 2010). Dans les cellules HeLa, TIP60 est recruté par YY1 au promoteur de HPV E6 et réprime la transcription à travers le répresseur BRD4.

1.2.7 Rôle pendant la réparation des CDBs

La dérégulation du complexe TIP60 a été reliée à l'oncogenèse (Avvakumov and Cote, 2007). En outre, TIP60 comme NuA4, est aussi impliqué directement dans la réponse aux dommages de l'ADN et plus spécifiquement la réparation des cassures double-brin de l'ADN (Bassi et al., 2016; Murr et al., 2006; Robert et al., 2006). TIP60 est recruté de manière très précoce aux sites de cassures où il serait stabilisé

par le complexe MRN (Chailleux et al., 2010; Robert et al., 2006). Ainsi aux CDBs, le complexe acétylerait la chromatine ainsi que potentiellement des substrats non histone.

1.2.7.1 Acétylation de la chromatine au site de dommage

L'acétylation de la chromatine par TIP60 sur l'histone H4 permet le remodelage de la chromatine pour donner l'accès à la machinerie de réparation. Notamment, la déplétion de TRRAP bloque l'hyperacétylation de H4 et l'ouverture de la chromatine permettant la liaison des facteurs de réparation (Murr et al., 2006). Même si ce n'est pas un facteur unique à TIP60, TRRAP semble responsable de la stabilisation du complexe à la cassure via l'interaction avec RAD50 une sous-unité du complexe MRN (Robert et al., 2006). Cependant, la formation des foyers γ H2AX ne semble pas sous la dépendance de TIP60 (Sharma et al., 2010). Par contre, l'acétylation de H4K16 par le complexe MOF est essentiel à l'ouverture de la chromatine, à la phosphorylation de H2AX en réponse aux dommages et au recrutement des facteurs de la DDR (Gupta et al., 2014; Sharma et al., 2010).

Au cours de la DDR, l'acétylation de H2A par TIP60 participerait au recyclage de γ H2AX à la cassure. Arp4 au sein de NuA4 lie γ H2AX et permettrait l'accumulation du complexe à la cassure et l'acétylation de la chromatine (Downs et al., 2004). Chez la drosophile, l'acétylation de la chromatine par TIP60 serait importante pour son éviction de la chromatine et notamment l'échange de dimères H2Av-H2B phosphorylés (Kusch et al., 2004). Ensuite, H4S1ph catalysée par CK2 inhibe l'acétylation par NuA4 durant la restauration de la chromatine pour bloquer la ré-acétylation des histones (Cheung et al., 2005; Utley et al., 2005). De la même manière, cette acétylation induirait la restauration de la chromatine via l'échange de dimère H2A-H2B mais aussi la déphosphorylation de H2A (Altaf et al., 2010; Jha et al., 2008; Kusch et al., 2004). La dynamique des dimères serait liée à l'ubiquitylation de H2A et impacterait le recrutement des facteurs de la DDR comme NBS1 (Ikura et al., 2015; Ikura et al., 2007). Récemment, il a été proposé que TIP60 participerait à l'incorporation de H2AZ à la cassure et interagirait avec ANP32E (Gursoy-Yuzugullu et al., 2015; Obri et al., 2014). Comme nous l'avons montré, la perte de Tip60/KAT5 affecte la dynamique de résolution des foyers γ H2AX qui peut traduire un défaut de réparation et/ou un défaut d'éviction des dimères modifiés (Sharma et al., 2010).

Globalement, son activité serait nécessaire au recrutement de RAD51 et à l'activation de la RH (Courilleau et al., 2012; Murr et al., 2006). Il a été suggéré que l'acétylation de H4K16 par TIP60 bloquerait la liaison du facteur décisionnel 53BP1 pour favoriser la résection ((Renaud et al., 2016; Tang et al., 2013); voir partie 3).

1.2.7.2 Autres fonctions

Chez l'humain, il a été proposé que TIP60 serait stabilisé à la cassure via le complexe MRN et ciblerait ATM (Sun et al., 2005). L'acétylation d'ATM par TIP60 provoquerait son activation. En effet, ATM semble présente dans la cellule sous forme de dimères inactifs, son auto-phosphorylation pendant la DDR dissocie ce dimère et conduit à son hyper-activation afin d'amplifier la réponse (Bakkenist and Kastan, 2003). ATM va alors phosphoryler H2AX ainsi que d'autres cibles impliquées dans la signalisation et l'activation des points de contrôle du cycle cellulaire (Sun et al., 2010). Parmi elles, CHK2 est un régulateur du point de contrôle du cycle cellulaire de la voie p53. De manière identique, DMAP1 joue un rôle dans l'activation d'ATM et la signalisation des checkpoints (Penicud and Behrens, 2014). D'autre part, TRRAP serait associée aux promoteurs de Mad1 et Mad2 avec TIP60 et PCAF de manière dépendante du cycle cellulaire pour l'activation du checkpoint mitotique (Li et al., 2004). Finalement, Tip60 acétylerait H4K12ac au niveau de l'hétérochromatine péricentromérique et régulerait la ségrégation des chromosomes (Grezy et al., 2016).

Chez la levure, Esa1 est clairement liée à l'activation des points de contrôle du cycle cellulaire en G2/M (Clarke et al., 2006; Smith et al., 1998). Il existe notamment une relation entre NuA4 et RAD9. C'est une protéine adaptatrice entre les kinases Mec1/Tel1 et les kinases effectrices RAD53 et CHK1. RAD9 est l'homologue de Crb2 chez *S.cerevisiae* et représente fonctionnellement la fusion de plusieurs protéines chez l'humain comme MDC1, BRCA1 et 53BP1. RAD9 possède notamment un domaine BRCT qui interagit avec γ H2AX et un TTD qui lie H3K79me. Chez la levure *S. cerevisiae* H4K20me n'existe pas, mais serait fonctionnellement remplacée par H3K79me de par la structure du nucléosome.

De façon intéressante, le complexe TIP60 est le substrat de nombreuses modifications posttraductionnelles comme l'acétylation, la phosphorylation, l'ubiquitylation et la sumoylation durant la DDR qui réguleraient potentiellement sa fonction. L'ubiquitylation de Tip60 par MDM2 induirait sa dégradation par le protéasome en réponse aux dommages (Dar et al., 2013; Legube et al., 2002) Bouhmik et al 2008). Aussi, sa sumoylation en réponse aux dommages induits par les UV impacterait son activité enzymatique (Cheng et al., 2008). Il a été proposé que la phosphorylation de Tip60 par CyclinB/Cdk2 ou GSK3 module son activité acétyltransférase (Charvet et al., 2011; Lemerrier et al., 2003). De plus, la phosphorylation de Tip60 par C-Abl aurait lieu au cours de la DDR pour l'activation d'ATM, la signalisation des points de contrôle et la survie (Kaidi and Jackson, 2013). Cette phosphorylation affecterait la liaison du CHD de Tip60 à H3K9me3 et le ciblage du complexe pendant la réparation (Sun et al., 2009). Cependant, ceci ne serait pas exclusif aux CDBs dans l'hétérochromatine puisqu'il y aurait méthylation de H3K9 transitoirement à la cassure (Ayrapetov et al., 2014). Ce

mécanisme serait général afin de bloquer la transcription aux CDBs. Il serait renforcé par l'incorporation de H2AZ par TIP60 à la cassure pendant la réparation (Gursoy-Yuzugullu et al., 2015). Ce modèle serait supporté par l'identification d'ANP32E comme étant une nouvelle sous-unité de TIP60 (Obri et al., 2014). L'ensemble de ce modèle reste cependant très controversé (Taty-Taty et al., 2014).

Finalement, TIP60 ou son homologue NuA4 ont été impliqués dans des fonctions plus secondaires. L'interaction de PLIP avec cPLA2 implique TIP60 dans le métabolisme des phospholipides et l'apoptose induite par le $TNF\alpha$ (Sheridan et al., 2001), le métabolisme du glucose (Lin et al., 2009) et l'autophagie (Lin et al., 2012). De plus, la présence de MRG15 pourrait relier TIP60 à l'épissage alternatif à travers H3K36me3 (Luco et al., 2010; Schwartz et al., 2009). D'autres part, DMAP1 au sein du complexe le relie potentiellement à la réplication (Ortega-Atienza et al., 2016). D'autres fonctions ont été attribuées au complexe TIP60 par exemple en dehors du noyau comme la régulation du cytosquelette (Mitchell et al., 2011) ou la régulation du précurseur du peptide β -amyloïde en lien avec la maladie d'Alzheimer (Baek et al., 2002).

En conclusion, le complexe TIP60 est considéré comme un régulateur clé de la fonction cellulaire principalement impliqué dans la différenciation cellulaire, l'apoptose, la sénescence, la régulation du cycle cellulaire et la réparation des dommages de l'ADN. *Plus spécifiquement, TIP60 serait impliqué dans la réparation des cassures double-brin de l'ADN qui sont des dommages particulièrement toxiques.*

1.3 Les cassures double-brin de l'ADN et leur réparation

1.3.1 Généralités sur les dommages de l'ADN et les cassures double-brin

Les dommages de l'ADN ont des origines endogènes et exogènes. Ils peuvent être issus des produits du métabolisme de la cellule, comme les espèces réactives de l'oxygène (ROS), ou exogènes et issus de l'environnement comme les radiations ionisantes ou les UVs. Différents types de dommages de l'ADN vont pouvoir être observés comme les cassures simple brin de l'ADN, la perte ou les modifications chimiques de bases, les mésappariements, les adduits de l'ADN et les pontages inter- ou intra-brin. Leurs proportions sont variables mais on considère que les cassures simple-brin sont abondantes. Elles sont le plus souvent issues de l'effondrement de la fourche de réplication et peuvent être à l'origine de cassure double-brin après la réplication. Les différents types de dommages vont être ciblés par des machineries spécialisées qui vont rétablir l'intégrité de l'ADN comme le NER, BER, MMR etc (Ceccaldi et al., 2016).

Les cassures double-brin (CDB) de l'ADN sont particulièrement toxiques car elles peuvent conduire à la perte de matériel génétique ou à la mort de la cellule en l'absence de réparation. Elles participent aussi à l'oncogenèse si elles sont improprement réparées. La cellule va donc coordonner toute une série d'évènements pour réparer au mieux les dommages, ce qui comprend la détection, l'arrêt transitoire du cycle cellulaire et la réparation en tant que telle (DDR). Chez les eucaryotes supérieurs, il existe 2 voies principales de réparation des CDBs: la jonction d'extrémité non-homologue (JENH ou NHEJ) et la recombinaison homologue (RH ou HR). La NHEJ est basée sur la re-ligature directe des extrémités de l'ADN alors que la RH utilise la chromatide sœur comme matrice pour re-synthétiser à l'identique la portion de la molécule endommagée. Lors de la NHEJ, les extrémités peuvent subir des modifications, c'est à dire un ajout ou une délétion de paires de base. On considère donc cette voie comme propice à la création d'erreurs ou infidèle même si cette assumption est de plus en plus remise en question (Betermier et al., 2014).

Les CDBs peuvent être aussi induites physiologiquement comme pendant la recombinaison V(D)J où il y a production des immunoglobulines. La recombinaison V(D)J est basée sur l'utilisation de la NHEJ et de sa capacité de modifier les extrémités produisant la diversité du système immunitaire. Durant la méiose, la recombinaison est également nécessaire pour le brassage génétique et la diversité des gamètes. Il y a donc induction de CDBs par la nucléase Spo11 qui seront réparés par RH (Jasin and Rothstein, 2013).

1.3.2 Les voies principales de réparation des cassures double-brin de l'ADN

Les 2 voies principales de réparation des CDB sont basées sur des facteurs spécifiques et des PTMs finement régulées (Dantuma and van Attikum, 2016). Une présentation rapide des facteurs impliqués dans la NHEJ et la RH va suivre dans les 2 prochaines sous-parties.

1.3.2.1 La jonction d'extrémités non-homologues

La NHEJ est la voie principale de réparation des CDBs qui peut avoir lieu en G1/S/G2 du cycle cellulaire (figure 1.9). Un défaut de signalisation de la NHEJ est à l'origine des translocations chromosomiques dans les cellules humaines et des fusions de télomères (Ghezraoui et al., 2014; Rai et al., 2010).

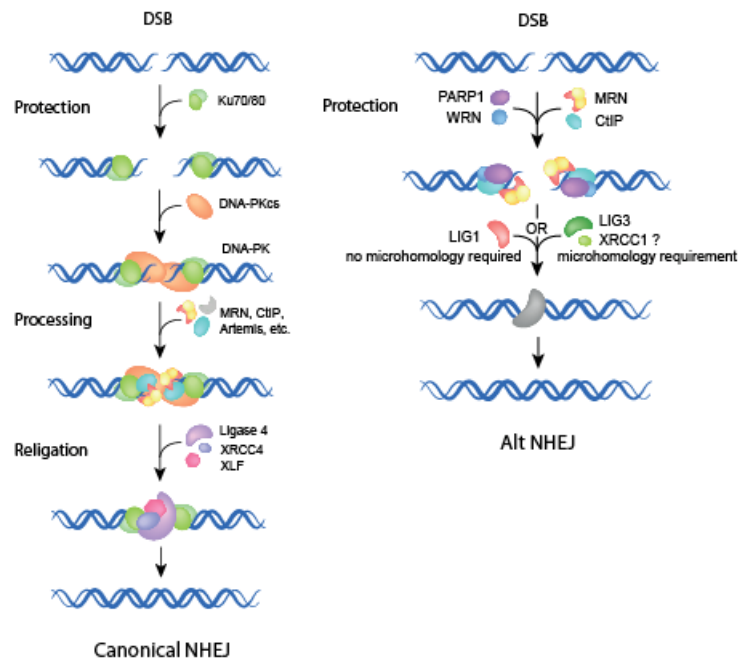


Figure 1.9: Représentation schématique simplifiée des voies de réparation par NHEJ canonique ou alternative (Adapté de (Dueva and Iliakis, 2013)). La voie canonique est basée sur la reconnaissance des extrémités par le complexe DNA-PK. À l'inverse, la voie alternative est dépendante de PARP1 mais partage le complexe de ligature avec la voie canonique

Les extrémités vont être liées très précocement par l'hétérodimère Ku70 et Ku80. Les protéines Ku ont une structure en anneau qui glisse sur l'ADN et protègent les extrémités de la résection. Elles vont ensuite recruter DNA-PKcs pour former le complexe DNA-PK actif. DNA-PKcs est une kinase de la

famille des PIKK. Son fonctionnement est aussi basé sur son autophosphorylation afin d'activer la réparation (pour revue (Jette and Lees-Miller, 2015)). La phosphorylation par DNA-PK a un rôle d'activation et d'inhibition de la réparation. Ses substrats comptent notamment RPA (Liu et al., 2012) et l'ARN-pol-II (Pankotai et al., 2012). De plus, DNA-PKcs contiendrait un domaine de type BRD spécifique de H2AXKac (Wang et al., 2015). Le complexe DNA-PK a une fonction de synapse pour garder les extrémités à proximité et permettre la ligature (Goodarzi et al., 2006; Ochi et al., 2010). Néanmoins, dans les cellules de patients atteints du syndrome de Cornelia DeLange, une diminution du CSR (*Class Switch Recombination*) semble corrélée avec une perte de NIPBL et un dysfonctionnement de la NHEJ (Enverald et al., 2013).

Les extrémités de la cassure peuvent subir des modifications comme une résection courte par MRN et CtIP. Des modifications plus importantes peuvent être régulées par Artemis. C'est une enzyme à activité endonucléase et exonucléase 5'-3' qui va être essentielle pendant la V(D)J. La modification des extrémités va produire des extrémités franches et permettre leur re-ligature directe (Liu et al., 2014).

La ligature va être catalysée par XRCC4-XLF-ADN ligase IV. XRCC4 et XLF (ou Cernunnos) sont des co-facteurs de la ligase qui s'organisent en multimères pour physiquement interagir avec l'ADN. PAXX est un paralogue de XRCC4 et XLF qui interagit avec Ku70/80 sous forme d'homodimères et favoriserait la ligature (Ochi et al., 2015). La phosphorylation du complexe de ligature par CK2, notamment sur XRCC4, est importante pour son activité (Koch et al., 2004).

1.3.2.2 La Recombinaison Homologue

Les extrémités de la cassure vont être liées par le complexe MRN formé par MRE11, RAD50 et NBS1 (figure 1.10). La résection des extrémités de l'ADN engage ensuite la CDB vers la RH. Elle va être initiée par MRN, qui possède une activité de résection à travers la nucléase MRE11. Une plus longue résection sera favorisée par CtIP (Sartori et al., 2007). Son activation est potentiellement régulée par une dynamique d'acétylation de CtIP par Gcn5 et SIRT6 (Kaidi et al., 2010; Robert et al., 2011). CtIP est phosphorylée par CDK2 et recrute ainsi BRCA1 en G2 (Yu and Chen, 2004). Finalement, l'ubiquitylation de CtIP par BRCA1 joue aussi un rôle dans son activation de la résection (Yu et al., 2006; Zhao et al., 2007). Sae2 possède une activité enzymatique mais celle-ci reste controversée chez son homologue CtIP. Une résection plus étendue implique les complexes EXO1-BLM ou BLM-Dna2 (Zhu et al., 2008). L'endonucléase Dna2 et l'exonucléase 5'-3' EXO1 vont être assistées par l'hélicase BLM dans 2 complexes distincts. La longueur de la résection va être dépendante du contexte de la cassure.

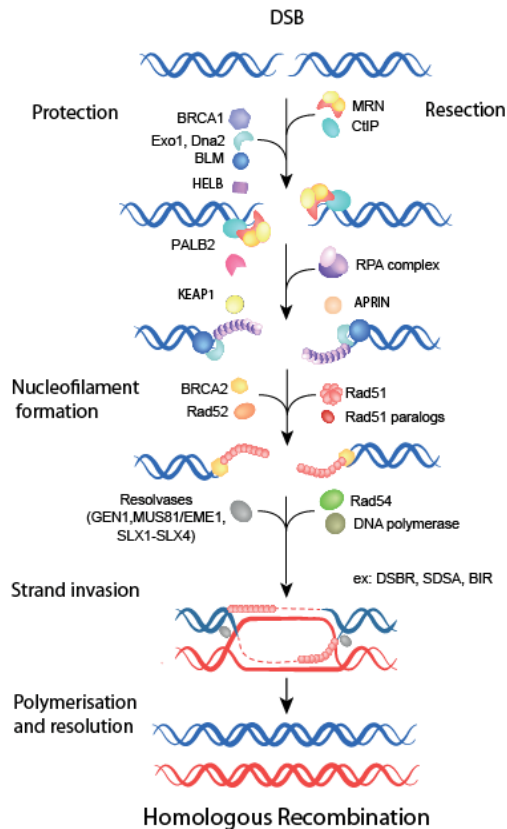


Figure 1.10: Représentation schématique simplifiée de la voie de recombinaison homologue (Adapté de Dueva et Illiakis 2013). La RH est majeure après la réplication lorsque la chromatide sœur est disponible pour servir de matrice. Elle a également lieu lors de la méiose et utilise le chromosome homologue. Elle peut se découper en 3 phases: pré-synaptique où le brin endommagé est stabilisé, synaptique caractérisée par l'invasion de brin et la migration des branches et post-synaptique qui implique la formation des jonctions de Holliday et leur résolution.

Le produit de la résection est un ADN simple brin 3' protubérant plus ou moins long qui va être lié par RPA. RPA est un complexe de 3 sous-unités RPA1, 2 et 3 (de 14, 32 et 70 kDa). C'est une ATPase dépendante de l'ADN qui protège l'ADN simple brin nu de la dégradation et de la formation de structures secondaires. Ainsi, RPA est aussi impliquée dans la réplication de l'ADN. HELB est recrutée par RPA pour limiter la résection de l'ADN. C'est un régulateur négatif qui va inhiber EXO1 et DNA2. HELB est régulée notamment via un mécanisme de translocation dans le cytoplasme au moment de la phase S (Tkac et al., 2016).

RPA va être remplacée par la recombinase RAD51 pour former un filament nucléoprotéique permettant l'invasion de brin. RAD51 est l'homologue de RecA chez *E.coli* (Shinohara et al., 1992). La transition RPA-RAD51 est permise par des médiateurs de la RH qui comprennent PALB2 et BRCA2. Ces médiateurs stimulent l'activité recombinase de RAD51 (Buisson et al., 2010). PALB2 est un facteur

particulièrement intéressant car il interagit avec de nombreux partenaires dont MRG15, une sous-unité de TIP60 et Sin3B (partie 2). PALB2 interagit aussi avec KEAP1 et le complexe ubiquityl-ligase CUL3-RBX1 (Orthwein et al., 2015). Sa poly-ubiquitylation impacterait sa stabilité au cours du cycle cellulaire afin de réguler le recrutement de BRCA1 à la cassure.

Les cohésines sont recrutées à la cassure et semblent impliquées dans la réparation des dommages en facilitant la proximité des extrémités de l'ADN et de la matrice (Caron et al., 2012; Nasmyth and Haering, 2009; Unal et al., 2004). En effet, APRIN, un facteur associé aux cohésines, interagit avec BRCA2 pour la localisation de RAD51 et BRCA2 (Brough et al., 2012). NIPBL est aussi recrutée à la cassure sous la dépendance de MDC1 et RNF168 (Oka et al., 2011).

Le brin homologue va s'ouvrir pour accueillir le nucléofilament afin de former une structure appelée *D-Loop* ou boucle de déplacement. La recherche d'homologie est nécessaire pour l'appariement et la formation des jonctions de Holliday (JH; (McGaughran et al., 2003)). RAD54 est une hélicase qui participe à l'activité de migration de branches et supporte la recherche d'homologie par RAD51 (Wright and Heyer, 2014). Les portions d'ADN manquantes vont ensuite être synthétisées par les ADN-polymérases pol- η et pol- ζ notamment (Buisson et al., 2014; Sharma et al., 2012). Les jonctions peuvent être dissoutes par le complexe BLM-Topoisomérase-III (Raynard et al., 2006).

La résolution des JHs est effectuée par les résolvases GEN1, Mus81-Eme1 et SLX1-4 (Wyatt and West, 2014). Ce sont des endonucléases qui vont cliver l'ADN au niveau des JHs pour conduire à 2 duplexes indépendants. RAD51 possède également 5 paralogues : XRCC2, XRCC3, RAD51B, C et D (Masson et al., 2001). Ils semblent fonctionner à plusieurs niveaux puisqu'ils sont nécessaires à la liaison de RAD51 et plus tardivement à la résolution des HJ (Liu et al., 2004; Rodrigue et al., 2013). La recombinaison est possible avec ou sans *cross over* et va conduire à plusieurs produits. L'étape de ligature restaure ensuite 2 molécules d'ADN double-brin intactes et homologues. Enfin, il est possible que la HJ se transforme en fourche de réplication pour recombiner avec l'ensemble du bras chromosomique (voie BIR pour *Break Induced Replication*).

1.3.2.3 Les autres voies de réparation

La NHEJ alternative est une voie de secours de la voie canonique activée en absence de certains facteurs comme l'ADN-ligase-IV ou les protéines Ku70/80 (Bennardo et al., 2008). Elle est basée sur l'utilisation de courtes micro-homologies de 2 à 4 nucléotides et de ce fait est plus infidèle, causant des délétions de séquences entre les homologies. Elle a été mise en évidence par inhibition de la voie

canonique et implique PARP1 et WRN ainsi que l'ADN-ligase-I ou 3 en complexe avec XRCC1 (Frit et al., 2014).

La voie du SSA (*Single Strand Annealing*) est un type particulier de RH qui a lieu lorsqu'une CDB se situe au niveau de séquences répétées (Ciccia and Elledge, 2010; Hartlerode and Scully, 2009). Elle nécessite un seul duplex d'ADN qui, lors de la formation d'ADNs simple-brin issus de la résection, va utiliser les séquences répétées pour s'hybrider et réparer. Le SSA n'implique pas de *cross over* et fonctionne sous la dépendance de RAD52 (Motycka et al., 2004).

L'Anémie de Fanconi (AF) est une maladie génétique rare caractérisée notamment par une haute incidence de cancers. Elle implique une vingtaine de gènes codant pour des protéines de réparation. Son diagnostic est basé notamment sur la sensibilité aux agents de pontage de l'ADN comme la mitomycine C. En effet, la voie de la FA est spécialisée dans la détection et la réparation des pontages inter-brin de l'ADN (ICL). De ce fait, BRCA2 et PALB2 sont également des protéines impliquées dans la FA. Elle est activée au cours de la phase S sous la dépendance d'ATR et semble intriquée dans la voie de RH mais nécessite aussi la coordination des voies d'excision de nucléotide et de la synthèse translésionnelle (NER et TLS). Les ICLs sont reconnus par le complexe cœur qui est un large complexe multiprotéique à activité ubiquityl-ligase. L'évènement central de la FA est la mono-ubiquitylation du sous-complexe FANCI-FANCD2, qui va servir de plateforme de recrutement à d'autres facteurs pour l'excision et la réparation du dommage. Ensuite, la voie de la FA rejoint la RH au niveau de l'invasion de brin (pour revue (Kim and D'Andrea, 2012). Une interaction entre FANCD2 et TIP60 a notamment été décrite reliant potentiellement le complexe à la régulation de l'AF (Hejna et al., 2010; Hejna et al., 2008; Renaud et al., 2016).

1.3.3 Réparation des CDBs dans un contexte chromatinien

La réparation des CDB fonctionne sur un modèle séquentiel dit de "détection, accessibilité et restauration" de la chromatine (Smerdon, 1991). La liaison des extrémités de l'ADN endommagé par des facteurs de réparation va déterminer quelle voie sera employée. La disponibilité et la stabilité des facteurs sont donc finement régulées. Le contexte chromatinien est essentiel pour la détection, la signalisation et la liaison de facteurs de réparation. En effet, l'hétérochromatine avec ses séquences répétées, présente un haut potentiel de recombinaison et nécessite donc une régulation plus fine de la DDR. En l'absence de gène ou de séquence codante, la fidélité n'est pas forcément nécessaire d'autant plus que la NHEJ est

plus économique en terme d'énergie. À l'inverse, la présence d'une cassure au sein d'un gène hautement transcrit va activer la RH (Aymard et al., 2014).

Il existe une compétition entre NHEJ et HR qui est principalement centralisée sur la liaison de 53BP1 au CDB (Bunting et al., 2010; Panier and Boulton, 2014). On considère que 53BP1 bloque la RH en inhibant la résection de l'ADN afin de réparer la cassure par NHEJ (Escribano-Diaz et al., 2013). La formation des foyers formés par 53BP1 a été largement étudiée. D'une part, 53BP1 est un lecteur de la chromatine multivalent à travers son domaine tandem-Tudor-UDR qui est spécifique de la méthylation de H4K20 et H2AK15ub (Botuyan et al., 2006; Fradet-Turcotte et al., 2013). De plus, la stabilisation de 53BP1 à la cassure est assurée par un mécanisme d'oligomérisation de la protéine (Lottersberger et al., 2013). 53BP1 impacte les autres facteurs décisionnels comme BRCA1 et CtIP qui sont aussi recrutés au niveau de la chromatine endommagée (Zimmermann and de Lange, 2014).

La complexité de la cassure peut aussi influencer le type de réparation mais la phase du cycle cellulaire reste un élément décisif majeur. En effet, la RH ne peut avoir lieu qu'en S et G2 lorsque la chromatide sœur est disponible, alors que la NHEJ peut avoir lieu tout au long du cycle cellulaire. Toutefois, le substrat de la recombinaison peut être le chromosome homologue conduisant potentiellement à la perte de diversité des allèles (ou LOH).

1.3.3.1 Contexte préalable au dommage: où et quand?

La décision entre les 2 voies de réparation est dépendante de la localisation de la cassure dans l'euchromatine ou l'hétérochromatine (figure 1.11). La collision des machineries de réplication, de transcription et de réparation peut avoir lieu dans les régions très actives du génome. À l'inverse, la compaction du génome dans l'hétérochromatine va nécessiter une signalisation et un remodelage différent. On considère que la réparation de l'ADN est plus lente dans l'hétérochromatine et sous la dépendance d'ATM (Goodarzi et al., 2008). De plus, au niveau de certains domaines, comme au télomère qui est riche en séquences répétées, la recombinaison homologue peut induire la perte d'une partie de chromosome. De la même façon, l'activation inappropriée de la NHEJ peut induire la fusion de chromosomes.

L'hétérochromatine est enrichie en H3K9me3 associée à HP1, KAP1, HDAC1/2 et KMTs (Craig, 2005). Lors de l'induction de dommages, la relaxation de l'hétérochromatine va donc impliquer des signaux particuliers. ATM va induire la phosphorylation de KAP1 et HP1 induisant un remodelage majeur de l'hétérochromatine (Ayoub et al., 2008; Goodarzi et al., 2008). L'activation d'ATM au niveau de

l'hétérochromatine impliquerait particulièrement TIP60 (Sun et al., 2009). Phospho-KAP1 bloque l'interaction avec CHD3 provoquant la relaxation de la chromatine par ISWI en l'absence de NuRD (Goodarzi et al., 2011; Klement et al., 2014).

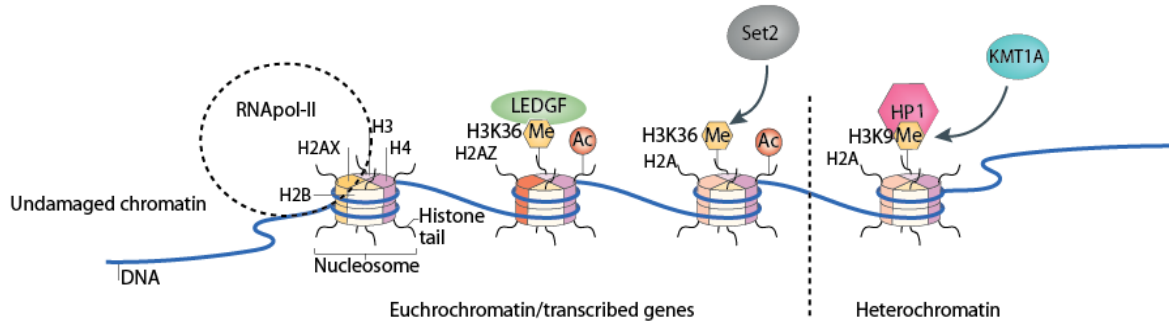


Figure 1.11: Influence de la structure de la chromatine préexistante sur la DDR (adapté de (Clouaire and Legube, 2015)). Dans l'euchromatine: la présence de variants d'histones, de PTMs et le niveau de transcription (à gauche). Dans l'hétérochromatine: l'absence de certains variants et/ou marques et la présence de H3K9me3/HP1 (à droite). HP1 est associé à KAP1 et CHD3.

À l'opposé, H3K36me3 est retrouvée sur la région codante des gènes transcrits et stabilise les nucléosomes pendant le passage de la machinerie de l'ARN polymérase (Schafft et al., 2003). Selon le modèle accepté, plus un gène est transcrit plus il doit être fidèlement réparé donc ciblé par la RH. La délétion de SET2 influence le choix des voies de réparation et va induire l'alt-NHEJ. Le niveau de H3K36me3 ne varie pas après induction de dommages et il n'y a pas recrutement de SET2 (Aymard et al., 2014). Cependant, LEDGF semble lier H3K36me3 via son domaine PWWP de façon constitutive et recrute CtIP en réponse à des dommages pour activer spécifiquement la RH (Daugaard et al., 2012).

La DDR est également dépendante de la présence de variants d'histone préalablement à l'induction de dommages. En effet, l'hétérochromatine semble réfractaire à la propagation du signal γ H2AX (Cowell et al., 2007; Kim et al., 2007a). De manière intéressante, il y aurait moins de H2AX dans l'hétérochromatine et l'amplification du signal de dommage y serait donc moins forte et moins rapide (Seo et al., 2014).

Ensuite, la phase du cycle cellulaire va impacter le choix de voie de réparation. En effet, il est important d'inhiber la résection de l'ADN et donc la RH en G1 afin de réparer par NHEJ en absence de chromatide sœur. Certaines protéines de la réparation vont être spécifiquement exprimées pendant certaines phases du cycle cellulaire comme BRCA1 et CtIP (Chen et al., 1996; Yu and Baer, 2000). Le

recrutement de 53BP1 va donc être régulé dépendamment du cycle cellulaire. Premièrement la phosphorylation de RNF8 par CDK1 en mitose bloque son interaction avec MDC1 et donc l'ubiquitylation subséquente de H2A (Orthwein et al., 2014). De plus, 53BP1 est aussi phosphorylée par différentes kinases au cours de la DDR. La phosphorylation de 53BP1 par ATM n'affecte pas la formation des foyers mais impacte ses effecteurs en aval.

RIF1 est l'effecteur principal qui interagit spécifiquement avec 53BP1 phosphorylée en G1 afin d'inhiber BRCA1 et CtIP (Escribano-Diaz et al., 2013; Zimmermann and de Lange, 2014). À l'inverse BRCA1 et CtIP inhibent RIF1 en S/G2 sous la dépendance de CDK1 qui phosphoryle CtIP. MAD2L2/Rev7, un co-facteur de Rev1, fonctionne ensuite en amont de RIF1 dans la même voie (Boersma et al., 2015). PTIP est un autre co-facteur de 53BP1 qui interagit de manière phospho-dépendante avec 53BP1 en G1 (Callen et al., 2013; Xiong et al., 2015). Ces 2 co-facteurs auraient une fonction différentielle selon la phase du cycle donc du substrat d'ADN.

De plus, la phosphorylation de 53BP1 par la kinase du cycle cellulaire CDK1 et PLK1 au sein du domaine UDR en mitose, bloque son recrutement à la chromatine. Cette phosphorylation sera contrecarrée par la phosphatase PP4C en G1 pour l'activation de la NHEJ (Lee et al., 2014; Orthwein et al., 2015). L'inhibition de la NHEJ évite ainsi la fusion de chromosomes en mitose pouvant conduire à l'aneuploïdie. Un dernier exemple est l'ubiquitylation de PALB2 qui va réguler le recrutement de BRCA1 à la chromatine endommagée de manière dépendante du cycle cellulaire (Orthwein et al., 2015). Il a été aussi observé que BRCA1 ubiquitylerait spécifiquement 53BP1 en S/G2 (Feng et al., 2015).

1.3.3.2 Signalisation et accessibilité du dommage

La signalisation des CDB va conduire à la concentration spatiale et temporelle de facteurs protéiques sous forme de foyers de réparation qui pourront être potentiellement visualisés via des techniques d'imagerie ou IRIF pour *ionising radiation induced foci* (figure 1.12; (Bekker-Jensen and Mailand, 2010)). Cependant, certains facteurs ne forment pas de foyers, même s'ils sont effectivement recrutés à la cassure et c'est notamment le cas du complexe TIP60 en l'absence de surexpression (Gong et al., 2015).

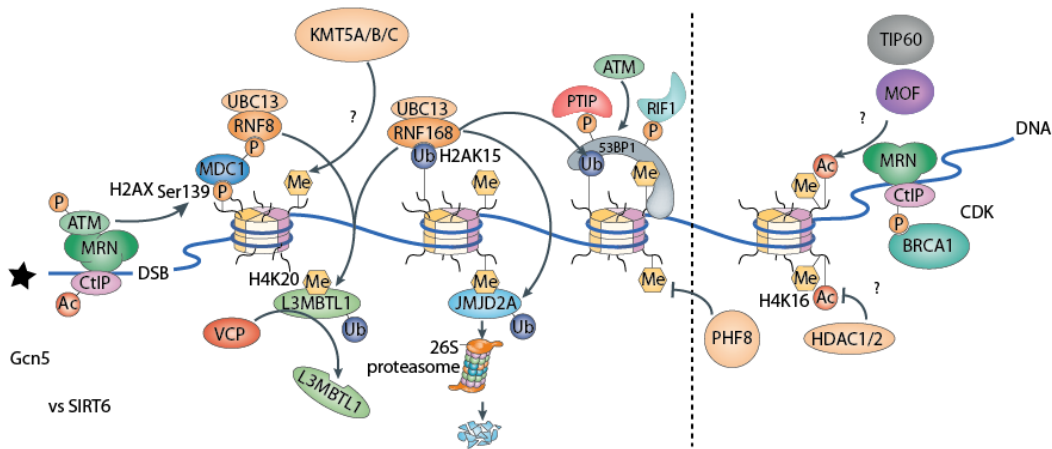


Figure 1.12: Détection d'une cassure double-brin dans un contexte de chromatine (adapté de (Lukas et al., 2011; Panier and Boulton, 2014)). Régulation de la présence et/ou de l'accessibilité de γ H2AX, H2AK15ub et H4K20me au sein de la chromatine comme déterminant de la DDR et du choix de voie de réparation des CDB de l'ADN entre NHEJ (à gauche) et HR (à droite).

1.3.3.2.a Le remodelage de la chromatine aux CDBs et insertion de variants

L'induction d'une cassure va induire un changement rapide de la structure de la chromatine (Kruhlak et al., 2006). En effet chez la levure comme chez l'humain, de nombreux complexes de remodelage dépendant de l'ATP sont recrutés aux CDBs à différentes étapes de la DDR. SWI/SNF est nécessaire à la réparation des CDB (Park et al., 2009). Le knockdown de BRG1 bloque la formation des foyers γ H2AX (Lee et al., 2010). BRM est également nécessaire au recrutement de Ku et à l'activation de la NHEJ (Ogiwara et al., 2011) mais aussi de la RH (Sinha et al., 2009). PBAF est aussi détecté à la cassure et permet le recrutement de PRC1 sous la dépendance d'ATM afin d'inhiber la transcription localement via H2AK119ubi (Kakarougkas et al., 2014).

Le complexe INO80 est capable d'interagir directement avec γ H2AX et sera recruté après sa formation (Morrison et al., 2004). La perte d'INO80 impacte la RH à travers la résection des extrémités de l'ADN (Gospodinov et al., 2011; van Attikum et al., 2004). Il semble aussi jouer un rôle chez la levure en phase S où il serait capable de stabiliser la fourche de réplication en condition de stress (Papamichos-Chronakis and Peterson, 2008).

SNF2H/SMARCA5, une sous-unité catalytique des complexes ISWI, est aussi recrutée aux dommages sous la dépendance de la déacétylation de H3K56 par SIRT6 (Toiber et al., 2013). Chez la levure, Fun30 est nécessaire à la résection dépendante d'EXO1 (Chen et al., 2012a). Son homologue

chez l'humain, SMARCAD1, semble capable de déplacer 53BP1 de la chromatine et d'activer la résection par EXO1 de manière PARP-dépendante (Costelloe et al., 2012).

Également, le complexe NuRD serait recruté à la cassure à travers les chaînes PAR. Son activité KDAC serait aussi impliquée dans l'inhibition de la transcription afin d'éviter la production de transcrits aberrants et d'éviter les interférences entre les machineries. CHD4 et son activité ATPase seraient aussi nécessaires à l'ubiquitylation de la chromatine et à la régulation de la transition G1/S à travers la déacétylation de p53 (Polo et al., 2010; Smeenk et al., 2010).

Le remodelage de la chromatine passe aussi par le recrutement de chaperons d'histone. Nucleolin est recrutée à la cassure pour l'éviction des dimères H2A-H2B (Goldstein et al., 2013). Ce recrutement a lieu en G1 à travers le complexe MRN via RAD50 et induirait la NHEJ. Alors que ces observations supportent une relaxation de la chromatine, un autre modèle propose l'induction de chromatine répressive transitoirement à la cassure (Gursoy-Yuzugullu et al., 2015; Miller et al., 2010). Cette hétérochromatinisation serait régulée par la PARylation de la chromatine pour permettre l'inhibition rapide des processus comme la transcription. Cette répression se traduirait notamment par l'incorporation de macroH2A (Khurana et al., 2014; Xu et al., 2012a) ainsi que de H2AZ à la cassure (Gursoy-Yuzugullu et al., 2015). Elle serait ensuite suivie de la relaxation de la chromatine et/ou d'une relocalisation de la cassure (Chiolo et al., 2011).

1.3.3.2.b Les PTMs de la chromatine induites par la DDR

Des PTMs de la chromatine dites *de novo* sont induites pendant la réponse aux dommages (Rossetto et al., 2010). Ensembles, elles vont permettre la régulation spatio-temporelle de l'activation de la DDR ainsi que sa terminaison (Dantuma and van Attikum, 2016). La phosphorylation du variant H2AX sur la sérine 139, ou γ H2AX est une PTM de la chromatine bien caractérisée qui va s'étendre jusqu'à 1,7 Mb de chaque côté de la cassure et persister jusqu'à plusieurs heures (Iacovoni et al., 2010; Rogakou et al., 1998). C'est aussi l'un des premiers événements de la DDR qui va initialiser une cascade de signalisation et sert de plateforme de recrutement aux médiateurs de la réparation (Panier and Durocher, 2013). Elle est catalysée par les kinases ATM, ATR et DNA-PK. L'activation d'ATR est médiée par l'ADN simple brin en phase S lors de l'effondrement de fourche de réplication et aux jonctions ADN simple/double-brin lors de la résection. Notamment γ H2AX sert au recrutement de MDC1 via son domaine tandem-BRCT C-terminal.

MDC1 va elle-même être phosphorylée par ATM et stabiliser l'enzyme à la cassure (Spycher et al., 2008). Le domaine FHA de RNF8 va reconnaître MDC1 phosphorylée et permettre l'ubiquitylation subséquente de la chromatine sur l'histone H2A. RNF8 et UBC13 présents à la cassure vont ubiquityler l'histone H1 (Thorslund et al., 2015). Ceci permet le recrutement et la rétention de RNF168 modifiant ainsi H2A et H2AX sur les résidus K13 et K15 (Mattioli et al., 2012). Cette ubiquitylation de H2A représente une faible proportion de H2A ubiquitylée. Cependant, elle va permettre le recrutement et la stabilisation de 53BP1 à la cassure via son domaine UDR pour l'activation de la NHEJ et l'inhibition de la résection (Fradet-Turcotte et al., 2013). L'ubiquitylation de la chromatine sur H2A participe aussi au recrutement de RAD18 et BRCA1 avec différents partenaires tels que RAP80, BARD1 ou ABRAXAS, MERIT40, BRCC36/45 (Shao et al., 2009a; Shao et al., 2009b). Il existe un mécanisme de compétition pour la liaison de H2AK15ub puisque cette marque est la cible commune de plusieurs protéines de la DDR comme RNF169, RAP80 et RAD18 par exemple (Fradet-Turcotte et al., en préparation). L'ubiquitylation de la chromatine va aussi permettre l'arrêt transitoire de la transcription dépendant d'ATM (Shanbhag et al., 2010). Globalement, on considère que la phosphorylation va guider l'ubiquitylation et constitue un niveau de signalisation supplémentaire.

53BP1 est un lecteur de marque bivalent qui lie H2A ubiquitylé en combinaison avec H4K20 méthylé. La synthèse de H4K20me induite à la cassure reste encore controversée (Botuyan et al., 2006). Bien que très abondante au sein du génome, l'apparition de H4K20me_{1/2} à la cassure a été détectée sous la dépendance de MMSET et SETD8 (Dulev et al., 2014; Pei et al., 2011). MMSET a longtemps été considérée comme une KMT potentielle de H4K20 et semble recrutée à la cassure (Tuzon et al., 2014). Toutefois, son activité enzymatique envers H4K20 reste discutée (Kuo et al., 2011; Pei et al., 2013). De manière intéressante, H4K20 peut aussi être acétylée au sein de la chromatine, suggérant qu'une potentielle interrelation entre ces modifications pourrait exister (Zheng et al., 2013b). Il a été suggéré que l'acétylation de H4K16 par TIP60 bloquerait la liaison de la lysine 20 par 53BP1 par un simple mécanisme d'encombrement stérique (Tang et al., 2013). Ce mécanisme serait aussi valable pour RAP80 (Renaud et al., 2016). Plus généralement, la déacétylation de H4 semble faciliter le recrutement de 53BP1 (Hsiao and Mizzen, 2013) et pourrait impliquer MOF à travers H4K16ac et 53BP1 (Gupta et al., 2014).

Il existe d'autres PTMs de la chromatine induites par les dommages. Contrairement à H3K36me₃, H3K36me₂ pourrait être générée à la cassure pour faciliter le recrutement de facteurs de la DDR (Fnu et al., 2011). La diméthylation de H3K36 par Metnase semble particulièrement induire la NHEJ. MMSET pourrait aussi être impliquée (Pei et al., 2013).

RNF20 et RNF40 catalysent l'ubiquitylation de H2B sur K120, ce qui a pour effet de recruter des facteurs de la RH (Nakamura et al., 2011). Les enzymes semblent interagir avec le complexe MRN et induisent le recrutement de SNF2H afin de faciliter la résection de l'ADN (Toiber et al., 2013). Toutefois, le recrutement de facteurs de la NHEJ a aussi été observé donc les 2 voies seraient régulées par H2Bub (Moyal et al., 2011). H2A serait aussi ubiquitylée sur sa queue C-terminale (K119) pour l'inhibition transitoire de la transcription au site de CDB.

Le complexe PR-DUB est aussi recruté à la cassure et semble favoriser le recrutement de facteurs de la RH (Citterio, 2015). Calypso, l'homologue de BAP1 chez la drosophile, est une DUB de H2A (Scheuermann et al., 2010). BAP1 serait impliquée dans la relaxation de la chromatine au site de dommage en relation avec BRCA1. Néanmoins le complexe PR-DUB ne cible pas H2AK15ubi (Sahtoe et al., 2016).

Durant la réparation, H4 est poly-neddylée au niveau de sa queue N-terminale sous la dépendance de RNF111 (Ma et al., 2013). Cette modification constituerait une voie alternative de recrutement de RNF168 au site de dommage dont l'un de ses MIU lie aussi NEDD8. La PARylation de la chromatine participe aussi au recrutement de facteurs de réparation. L'ubiquityl-ligase ChFr est localisée aux CDBs indépendamment de γ H2AX via son domaine à doigt de zinc carboxy-terminal qui lie les chaînes de PAR (Oberoi et al., 2010). ChFr et RNF8 travailleraient de façon synergétique pour l'ubiquitylation de la chromatine sur H2A et H2B durant la DDR (Wu et al., 2011). Ces 2 facteurs ubiquitylraient la chromatine sur H2BK120 ensuite reconnue par MRG15 pour cibler l'acétylation d'H4 et l'activation d'ATM (Wu et al., 2011). Enfin, la sumoylation semble aussi réguler la DDR. PIAS1 et PIAS4 sont recrutées aux CDBs sous la dépendance de MDC1 et impactent le recrutement de 53BP1 et BRCA1 via un mécanisme encore inconnu (Galanty et al., 2009; Morris et al., 2009).

Finalement selon le modèle d'hétérochromatinisation transitoire, Suv39H1 serait recrutée pour catalyser H3K9me3 à la cassure, de même que KDM5B (déméthylase de H3K4me) afin d'inhiber la transcription (Ayrapetov et al., 2014). Ceci permettrait le recrutement de HP1 et KAP1 et l'insertion de macroH2A (Xu et al., 2012a). KDM4D (déméthylase de H3K9me) serait ensuite recruté à la cassure pour la seconde phase de remodelage qui impliquerait alors l'ouverture de la chromatine.

1.3.3.3 Autres mécanismes impliqués dans la DDR

La formation d'ARN à la cassure double-brin ou diRNA semble jouer un rôle important au cours de la réponse aux dommages. D'une part, la formation d'ARN non-codant semble nécessaire à la création d'un environnement chromatinien propice au recrutement des facteurs de réparation (pour revue Di Fagagna, 2014). Certaines protéines de la DDR seraient notamment capables de lier les ncRNA comme 53BP1 (Morris et al., 2009) et BRCA1 (Ganesan et al., 2002). De petits ncRNAs provenant du locus endommagé sont produits sous la dépendance de DICER et DROSHA (Francia et al., 2012). Ils n'affectent pas la formation de γ H2AX mais agiraient en aval. Ce mécanisme semble conservé de la plante à l'humain sous la dépendance d'ATR (Wei et al., 2012).

Les ncRNA induiraient spécifiquement la RH, serviraient potentiellement de matrice pour la réparation chez la levure (Keskin et al., 2014; Storici et al., 2007) et joueraient aussi un rôle chez l'humain (Sharma et al., 2015). À l'inverse, les miRNAs semblent également réguler directement l'expression de certaines protéines de la DDR (Sharma and Misteli, 2013).

La formation de R-loops au cours de la transcription semble aussi impacter la DDR. Ce sont des hydrides double-brin ADN-ARN observés sous la dépendance de BRCA2 (Bhatia et al., 2014). BRCA1 est aussi recrutée au niveau des régions terminatrices formant des R-loops (Hatchi et al., 2015).

Un mécanisme de compétition similaire à celui impliquant H2AK15ub existe pour H4K20me. Si H4K20me n'est pas synthétisée *de novo*, un autre modèle propose un mécanisme de masquage de la marque et de compétition entre les différents lecteurs de H4K20me₂ comme 53BP1, JMJD2A et L3MBTL1. H4K20me serait liée par des facteurs au sein du génome qui devront être spécifiquement déplacés au cours de la DDR pour laisser leur place à 53BP1 ou BRCA1. RNF8/168 ubiquitylent JMJD2A pour le cibler au protéasome (Malette et al., 2012), ou VCP pour réguler le déplacement de L3MBTL1 de la chromatine (Acs et al., 2011), rendant ainsi la marque accessible localement au site de cassure pour 53BP1.

Finalement, les protéines de réparation vont être les substrats de diverses modifications posttraductionnelles finement régulées de manière séquentielle, parallèle ou combinatoire. Comme cela a été illustré pour 53BP1 précédemment, RNF8/138 ubiquitylent Ku pour l'inhibition de la NHEJ (Feng and Chen, 2012; Ismail et al., 2015). Il existe donc un code de PTM extrêmement complexe pour réguler les différents facteurs de la DDR (pour revue (Dantuma and van Attikum, 2016)).

1.3.4 Restauration de la chromatine

La restauration de la chromatine est essentielle à la terminaison de la DDR. Cette restauration passe par l'éviction et la déphosphorylation de γ H2AX de la chromatine et va impliquer son acétylation par TIP60 (voir partie 2). Plusieurs phosphatases dont PP2A, Wip1, PP6, PP4 vont déphosphoryler γ H2AX (Chowdhury et al., 2005; Chowdhury et al., 2008; Douglas et al., 2010; Keogh et al., 2006a; Macurek et al., 2010; Nakada et al., 2008). Ceci est nécessaire à la réparation en tant que telle et à la sortie des points de contrôle du cycle cellulaire (Keogh et al., 2006a). Notamment, FACT est poly-ADP-ribosylée en réponse aux dommages et n'est alors plus capable d'interagir avec la chromatine mettant fin à sa fonction d'éviction des dimères d'histones (Heo et al., 2008). Le complexe PR-DUB serait aussi nécessaire à la restauration de la chromatine à travers la levée d'inhibition de la transcription dans la chromatine à proximité du dommage via la dé-ubiquitylation de H2AK119 (Citterio, 2015; Yu et al., 2014).

De plus, l'incorporation de nouvelles histones nécessite à nouveau l'implication du complexe de remodelage INO80 (Papamichos-Chronakis et al., 2006). D'autres chaperons vont être nécessaires à l'incorporation de nouvelles histones porteuses de H3K56ac au niveau de l'ADN réparé, comme ASF1 (Chen et al., 2007; Neumann et al., 2009; Polo et al., 2006). De plus, la ré-initialisation de la transcription nécessite l'implication de HIRA pour l'incorporation de H3.3 (Adam et al., 2013). La fonction des chaperons CAF1 et ASF1 semble également étroitement liée à la terminaison des checkpoints (Kim and Haber, 2009).

1.4 But du projet de doctorat

La composition du complexe TIP60/NuA4 a été étudiée au sein de mon laboratoire d'accueil par des étudiants avant moi. Sa fonction durant la réparation des CDBs est inspirée en partie par des travaux effectués chez la levure sur le complexe NuA4. Nous savons qu'Arp4 stabilise NuA4 à la cassure via γ H2AX. De plus, des données non publiées de mon laboratoire indiquent que NuA4 est recruté à la cassure par Xrs2 en G2, l'homologue de NBS1 chez la levure. Cette interaction serait dépendante de la phosphorylation de NuA4 en réponse aux dommages de manière CDK-dépendante. De plus, NuA4 active la résection catalysée par Exo1 et affecte la liaison de RPA (Jobin-Robitaille et al., en préparation). Alors que les 2 complexes semblent être des activateurs de la RH, ils présentent néanmoins des différences structurales et la fonction exacte de TIP60 au cours de la DDR demeure imprécise.

Mon projet de doctorat s'est donc découpé en 3 axes: comprendre le recrutement du complexe TIP60 à la cassure, sa régulation durant la réparation et sa fonction exacte au cours de la DDR. Mes objectifs étaient de purifier le complexe TIP60 natif afin d'effectuer des expériences de spectrométrie de masse pour identifier des partenaires et étudier les modifications posttraductionnelles du complexe comme l'acétylation et la phosphorylation. Le complexe purifié serait aussi utilisé dans des essais biochimiques d'acétylation et/ou d'interaction avec des facteurs de réparation. Nous avons choisi de développer différentes méthodes d'édition du génome pour la purification de complexe natif en collaboration avec Yannick Doyon. À la base de ces travaux, des expériences préliminaires ont identifiées une potentielle nouvelle sous-unité du complexe: MBTD1. Cette protéine possède un domaine de lecture de la chromatine et a été décrite comme un possible lecteur de H4K20me, tout comme la protéine 53BP1. Il existe déjà un lien entre NuA4 et l'homologue de 53BP1 chez la levure RAD9. J'ai donc confirmé que MBTD1 est associée de façon stable avec le complexe et colocalise avec d'autres sous-unités à l'échelle du génome entier. Sa spécificité pour H4K20me a été étudiée ainsi que son interrelation avec 53BP1, suggérant un modèle de compétition entre 53BP1 et MBTD1.

Dans un second projet, je me suis intéressée à la régulation du complexe TIP60 à travers les PTM au cours de la réparation (chapitre 4). L'induction de dommages modifie le profil de phosphorylation et d'acétylation du complexe. L'acétylation de Tip60/KAT5 sur un résidu conservé au sein de son chromodomaine nous a particulièrement intéressé.

De plus, j'ai cherché à clarifier la fonction du complexe durant la réparation via l'identification de nouveaux substrats d'acétylation. De façon intéressante, l'identification d'un nouveau substrat au sein de la chromatine a éclairci la fonction de TIP60 et l'interrelation avec 53BP1. En effet, TIP60 bloque l'ubiquitylation de la chromatine nécessaire au recrutement de 53BP1 en modifiant le même résidu sur

H2A. À l'opposé, l'ubiquitylation de H2A inhibe le ciblage de la chromatine par TIP60. Finalement, l'identification de plusieurs substrats potentiels de TIP60 au sein de la RH suggère un rôle plus tardif du complexe dans cette même voie. L'ensemble de ces travaux a permis d'éclaircir la régulation et la fonction de TIP60 au cours de la réparation des cassures double-brin de l'ADN. Certains aspects de mes travaux de doctorat dépassent le cadre de cette thèse et seront présentés en appendices.

2. Chapitre 2: A Scalable Genome-Editing-Based Approach for Mapping Multiprotein Complexes in Human Cells

Mathieu Dalvai^{1,2}, Jeremy Loehr^{1,2}, Karine Jacquet¹, Caroline C. Huard¹, Céline Roques¹, Pauline Herst¹, Jacques Côté¹ & Yannick Doyon¹

¹Centre Hospitalier Universitaire de Québec Research Center and Faculty of Medicine, Laval University, Quebec City, QC, Canada.

²These authors contributed equally to this work.

Correspondence should be addressed to Y.D.(Yannick.Doyon@crchudequebec.ulaval.ca)

Résumé

La purification d'affinité couplée à l'analyse par spectrométrie de masse (AP-MS) est une méthode classique largement utilisée pour étudier les réseaux d'interactions et les fonctions protéiques. Toutefois, c'est une méthode sensible aux perturbations dues à la surexpression des protéines cibles et ne reflète pas les régulations complexes en réponse à des stimuli divers. Nous avons développé ici une méthode alliant édition du génome et étude protéomique afin d'isoler des complexes natifs à partir de leur contexte physiologique. Les outils CRISPR/Cas9 et TALEN ont été utilisés afin d'étiqueter les gènes endogènes et purifier des enzymes présentes au sein de complexes de modification de la chromatine et de la réparation de manière homogène. Nous avons ainsi découvert de nouvelles sous-unité et interaction au sein de complexes déjà largement caractérisés. De plus, l'isolation de MCM8/MCM9 illustre l'efficacité et la robustesse de cette approche. En conclusion, cette méthode améliore et facilite l'exploration des interactions protéiques à petite et à grande échelle et rend possible l'étude des activités biochimiques et des liens structure-fonction.

Abstract

Conventional affinity purification followed by mass spectrometry (AP-MS) analysis is a broadly applicable method to decipher molecular interaction networks and infer protein function. However, it is sensitive to perturbations induced by ectopically overexpressed target proteins and does not reflect multilevel physiological regulation in response to diverse stimuli. Here we developed an interface between genome editing and proteomics to isolate native protein complexes produced from their natural genomic contexts. We used CRISPR/Cas9 and TALENs to tag endogenous genes and purified several DNA repair and chromatin modifying holoenzymes to near homogeneity. We uncovered novel subunits and interactions amongst well-characterized complexes and report the isolation of MCM8/9, highlighting the efficiency and robustness of the approach. These methods improve and simplify both small and large-scale explorations of protein interactions, as well as the study of biochemical activities and structure-function relationships.

2.1 Introduction

The cell is composed of a collection of protein machines responsible for the coordinated execution of cellular functions (Alberts, 1998). Deciphering the components and activities of these molecular assemblies is crucial to understand the cellular networks that are perturbed under disease states (Gavin et al., 2011; Rolland et al., 2014). For example, the identification of cancer-driving mutations amongst a background of passenger mutations can be improved by tying combinations of rare mutations to specific protein complexes (Krogan et al., 2015; Leiserson et al., 2015; Rolland et al., 2014). Besides, the growing list of cancer related genes often comprises uncharacterized proteins for which focused proteomic studies could help uncover function (Lawrence et al., 2014; Vogelstein et al., 2013).

Affinity purification followed by mass spectrometry (AP-MS) analysis is a powerful approach to characterize protein-protein interactions and multiprotein complexes which are defined as sets of stably associated proteins isolated under standardized biochemical conditions (Gavin et al., 2011). Landmark studies describing genome-wide identification of complexes in budding yeast generated high quality datasets by relying on two major technical innovations (Gavin et al., 2006; Krogan et al., 2006). First, the development of standardized tandem affinity purification (Guruharsha et al., 2011) protocols allowed the isolation of complexes by sequential capture and elution using pairs of affinity tags (Rigaut et al., 1999). Second, systematic tagging of open reading frames on the chromosomes via homologous recombination permitted to retain the physiological regulation of gene expression for the bait proteins.

While pioneering studies in *Arabidopsis*, *Drosophila*, and human cells using ectopic expression of tagged proteins have yielded important insights into biological pathways in higher eukaryotes (Behrends et al., 2010; Goudreault et al., 2009; Guruharsha et al., 2011; Hegemann et al., 2011; Hutchins et al., 2010; Huttlin et al., 2015; Marcon et al., 2014; Sardiù et al., 2008; Sowa et al., 2009; Van Leene et al., 2010), there is a need to keep improving these methods in order to reduce perturbations in the stoichiometry of protein interactions and prevent aberrant localization, protein aggregation, dominant negative effects and toxicity (Doyon et al., 2011; Ho et al., 2002). For example, chromatin modifying complexes require meticulous biochemical characterization since they often exist in different forms with paralogous subunits and only their native assembly can recapitulate their specificity for a given histone residue within chromatin (reviewed in (Lalonde et al., 2014)). Hence, we developed straightforward methods to streamline the mapping of protein-protein interactions in human cells under settings minimizing deviations from their natural context. We used engineered nucleases such as zinc-finger nucleases (ZFNs), TAL effector nucleases (TALENs) and clustered regularly interspaced short

palindromic repeats (CRISPR)/Cas9 to simplify the generation of cell lines with tailored modifications and enable the expression of tagged proteins from their endogenous loci (Hsu et al., 2014; Joung and Sander, 2013; Sternberg and Doudna, 2015; Urnov et al., 2010). First, we exploited a genomic safe harbor locus to rapidly and reliably generate cell lines expressing bait proteins at near physiological levels as a surrogate to classical plasmid- or virus-based methods for stable cell line generation. Second, we introduced an affinity tag at the N and C-terminus of proteins encoded by endogenous genes in order to retain the dynamic control of gene expression specified by the native chromosomal context and the natural post-transcriptional regulation mechanisms. Under these conditions, we obtained near homogenous preparations of native protein complexes in sufficient amounts to perform biochemical assays and identify their subunits via mass spectrometry analysis. The tagged cell lines were also used for immunoprecipitation of cross-linked chromatin fragments (Chromatin Immunoprecipitation, ChIP) to study protein-DNA interactions *in vivo* under normalized conditions. These tools were portable to numerous proteins and represent a general solution for protein isolation, complex identification, and genome location analysis under physiological conditions. Importantly, the scalability and adaptability of this system will open avenues for the systematic and unbiased mapping of protein-protein networks in a variety of organisms.

2.2 Results

2.2.1 Characterization of a Potent Tandem Affinity Tag

An ideal TAP tag leads to high recovery of a fusion protein present at low concentration with minimal background contaminants. It should be functional as N and C-terminal fusions and its size and amino acid (AA) sequence should have no impact on protein function. In preliminary experiments we evaluated several tags including the AC-TAP, SBP, FLAG-HA tags and settled on a combination of 3xFLAG and 2xSTREP tags as both tags can be eluted under gentle conditions and yield to the isolation of highly purified material (see below) ((Doyon et al., 2006) and data not shown). Our version contains 59 AA for a predicted molecular weight of 6 kilodaltons (kDa) and does not necessitate proteolytic cleavage (Figure 2.1A).

To fine-tune our purification scheme we selected the KAT5/TIP60 tumor suppressor protein, the catalytic subunit of the NuA4 (Nucleosome acetyltransferase of histone H4) complex that regulates gene expression, promotes DNA repair via homologous recombination and is required for embryonic stem cells self-renewal and differentiation (Steunou, 2014). NuA4 is composed of more than 15 subunits ranging from 20 to 400 kDa in size (Cai et al., 2005; Doyon et al., 2006; Doyon et al., 2004; Ikura et al., 2000). We

first established two independent pools of cells expressing KAT5 fused to a C-terminal TAP tag and performed purifications from whole cell extracts to determine the proper order of steps required to achieve high yields and purity. We observed that the high binding capacity of the anti-FLAG M2 affinity resin is best used as a first step to recover the maximal amount of complexes while the Strep-Tactin resin increases dramatically the purity of the final samples yielding to near homogenous preparations from low amounts of starting material (Figure 2.S1).

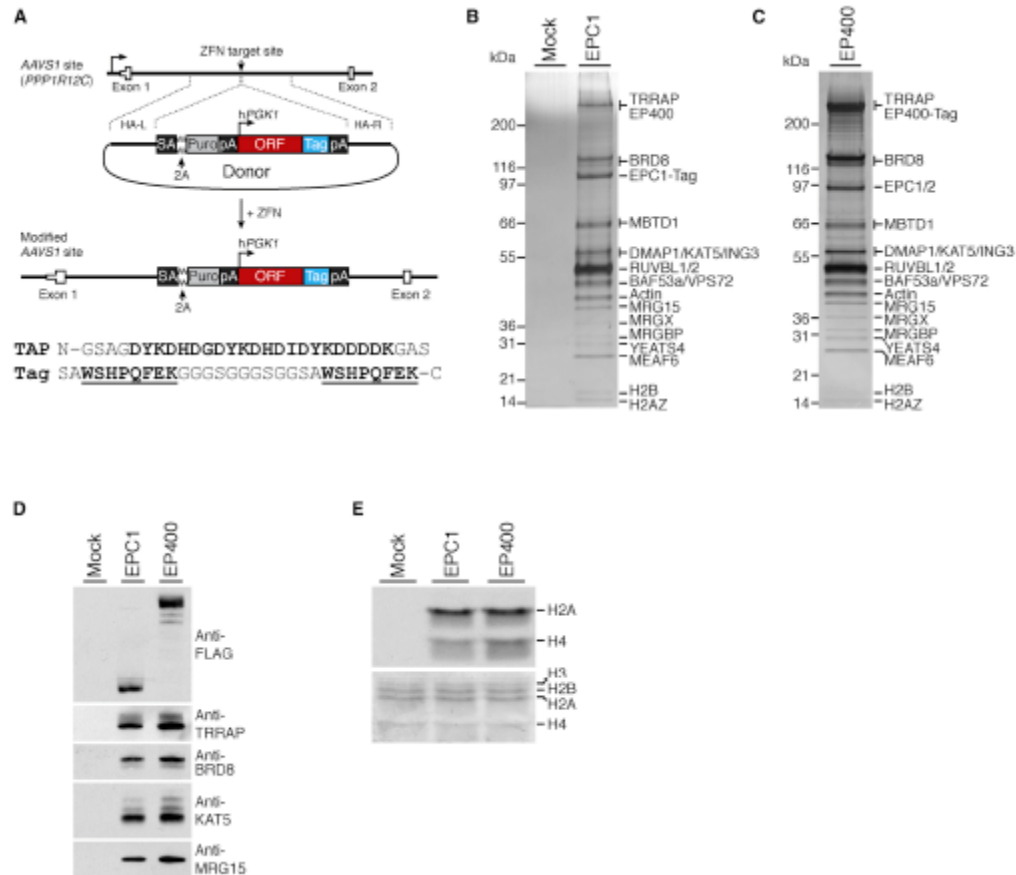


Figure 2.1. ZFN-Driven Gene Addition to the AAVS1 Locus Simplifies Tandem-Affinity Purification of Multisubunit Protein Complexes

(A) Schematic of the donor construct and of the AAVS1 locus following cDNA addition. The first two exons of the *PPP1R12C* gene are shown as open boxes. Also annotated are the locations of the splice acceptor site (SA), 2A self-cleaving peptide sequence (2A), puromycin resistance gene (Puro), polyadenylation sequence (pA), human phosphoglycerate kinase 1 promoter (hPGK1), 3xFLAG-2xSTREP tandem affinity tag (Hateboer et al., 1995), homology arms left and right (HA-L, HA-R) are respectively 800 and 840 bp. Sequence of the TAP tag. 3xFLAG sequence is in bold and 2xSTREP is in bold and underlined. (B) Silver stained SDS-PAGE showing the purified EPC1 complex. K562 cells expressing the tag (Mock) and a clonal cell line expressing EPC1-tag (EPC1). (C) Silver stained SDS-PAGE showing the purified EP400 complex from a clonal cell line expressing EP400-tag (EP400).

Proteins were identified from unfractionated protein samples and assigned to specific gel bands based on extensive western blotting analysis. (D) Western blots of selected NuA4 subunits on purified fractions. (E) Autoradiogram showing the results of HAT assays to determine the specificity of the EPC1 and P400 complexes. Coomassie staining was used as a loading control for histones. See also Figures 2.S1.

2.2.2 Tandem-Affinity Purification Following Nuclease-Driven Gene Addition to the AAVS1 Genomic Safe Harbor Locus

In order to rapidly generate isogenic cell lines expressing TAP tagged cDNAs, we used nuclease-driven targeted integration into the human *PPP1R12C* gene, a safe harbor genomic locus known as *AAVS1* that allows stable transgenesis and neutral marking of the cell (DeKolver et al., 2010; Hockemeyer et al., 2009a; Lombardo et al., 2011). This system is composed of a nuclease that cleaves the first intron of *PPP1R12C* and a gene-trap vector allowing puromycin selection of targeted cells. We adapted this system to integrate tagged cDNAs and used the moderately active human *PGK1* promoter to achieve slight overexpression conditions (Figure 2.1A and see below). We targeted two subunits of NuA4 to the *AAVS1* locus and purified the associated complexes. We chose the enhancer of polycomb homolog 1 (EPC1) and the E1A binding protein p400 (EP400) as model proteins. Due to their size, respectively 100 and 400 kDa, we reasoned that it would represent a substantial test for biochemical stability during purification. Likewise, targeting required error-free ZFN-driven addition of their relatively large expression cassettes of 4.3 kb and 11.3 kb.

K562 cells were selected as our model cell line because they can be cultivated, expanded, and transfected with high efficiency as suspension cultures. They are also permissive to genome editing events and tolerate cloning via either limiting dilution or in semi-solid media. Moreover, as a designated tier 1 cell line used by all investigators of the Encyclopedia of DNA Elements (Consortium) project, a myriad of genomic and epigenomic data is available for this cell line (Consortium, 2012).

We first transfected K562 cells with *AAVS1*-targeting ZFNs and the *EPC1* donor and selected clones in methylcellulose-containing media supplemented with puromycin (Figure 2.1A). Single cell-derived colonies were picked after 10 days, expanded, and transgene expression was monitored by western blot. In a typical experiment, more than 90 % of the clones expressed the transgene with little variability (see Figure 2.S1 for an example). Nuclear extracts were prepared from an EPC1-tag cell line, as well as from K562 cells expressing only the tag (Mock), and subjected to TAP. EPC1 complex subunits separated by SDS–polyacrylamide gel electrophoresis (SDS–PAGE) could be unambiguously identified on silver stained gels due to the very low protein background observed in the mock purification after

double-affinity purification (Figures 2.1B). Mass spectrometry analysis identified all known components of NuA4, in addition to MBTD1, which was not previously ascertained as a core complex subunit (Cai et al., 2005; Doyon et al., 2006; Doyon et al., 2004; Ikura et al., 2000) (Table S1). Next, we performed a reciprocal purification of the complex by repeating the process with *EP400*, coding for the large SWI/SNF2-family ATPase that incorporates histone variant H2A.Z into chromatin (Weber and Henikoff, 2014). We obtained a complex that was indiscernible from the EPC1 assembly (Figures 2.1C, 1D ; Table S1). In contrast to previously published data, the EP400 complex contains the KAT5 catalytic subunit (Fuchs et al., 2001). It appears that overexpression of EP400 that was achieved using retroviral-based gene delivery in the previous study resulted in the purification of a partially assembled complex.

An important characteristic of our system is that the purified fractions can be assayed biochemically *in vitro*. To determine if the purified complexes are recovered in sufficient amounts and concentration, we performed histone acetyltransferase (HAT) assays. We observed robust enzymatic activity for both complexes with substrate specificity consistent with published reports for KAT5/NuA4 (Doyon et al., 2004; Ikura et al., 2000) (Figure 2.1E). Again, these observations contrast with the minimal traces of HAT activity observed for the EP400 complex and the reported disconnection between these two enzymatic activities (Fuchs et al., 2001; Park et al., 2010; Tyteca et al., 2006). Taken together, these data demonstrate that coupling our TAP approach with gene targeting at *AAVS1* creates a highly efficient surrogate method for the isolation of native protein complexes under near physiological conditions.

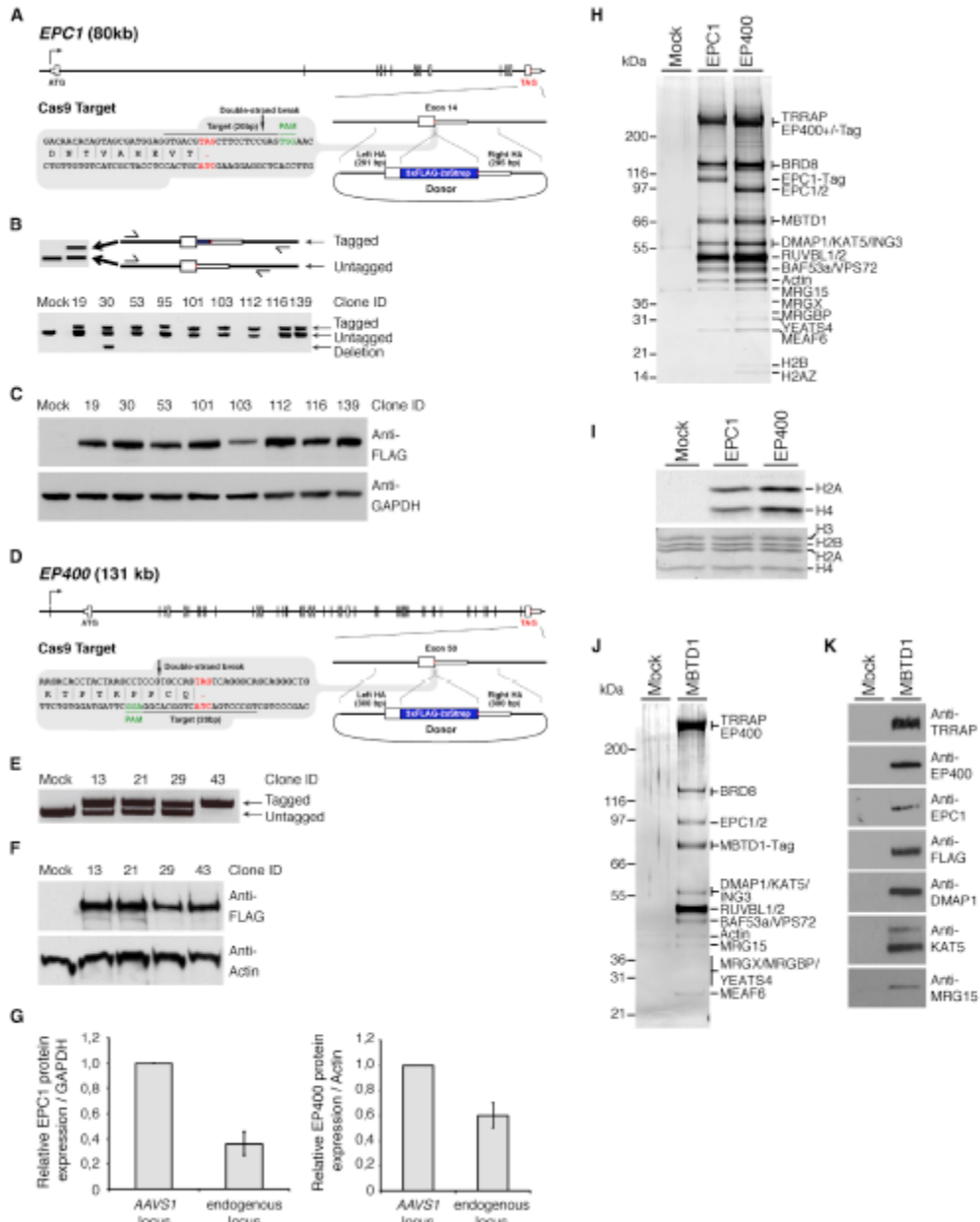


Figure 2.2. CRISPR/Cas9-Driven Tagging of NuA4 Subunits Enables Reciprocal Tandem-Affinity Purification of the Endogenous Native Complexes

(A) Schematic of the *EPC1* locus, Cas9 target site, and donor construct used to insert the TAP tag to the C-terminus of the *EPC1* protein. Annotated are the positions of the stop codon (Hateboer et al., 1995), the protospacer adjacent motif (PAM) that specifies the cleavage site, and homology arms left and right (HA-L, HA-R). (B) Schematic and results of a PCR-based assay (Out-Out PCR) to detect targeted integration (TI) of the tag sequence in single-cell derived K562 clones obtained by limiting dilution. Primers are located outside of the homology arms and are designed to yield a longer PCR product if the tag is inserted. (C) Western blots showing *EPC1*-tag protein expression in K562 clones. Mock indicates cells

treated with donor and Cas9 nuclease in absence of gRNA. The FLAG M2 antibody was used to detect EPC1 and the GAPDH antibody was used as a loading control. (D) Targeting scheme for EP400, depicted as in A. (E) Same as B, but for EP400. (F) EP400 expression monitored as in C. (G) Two-fold serial dilutions of whole cell extracts prepared from AAVS1-EPC1/EP400 and CRISPR-EPC1/EP400 cell lines were analyzed by western blot to determine the relative expression of EPC1-tag proteins. (H) Silver stained SDS-PAGE showing the purified EPC1 and P400 complexes. Wild-type K562 cells (Mock) and clonal cell lines expressing EPC1-tag and EP400-tag from their endogenous loci. (I) Autoradiogram showing the results of HAT assays to determine the specificity of the complexes. Coomassie staining was used as a loading control for histones. (J) Silver stained SDS-PAGE showing the purified MBTD1 complex. (K) Western blots of selected NuA4 subunits on purified fractions. Wild-type K562 cells (Mock). Proteins were identified from unfractionated protein samples and assigned to specific gel bands based on extensive western blotting analysis. See also Figures 2.S2-S3.

2.2.3 Tandem-Affinity Purification of Native Multisubunit Protein Complexes following CRISPR/Cas9-Driven Tagging of Endogenous Genes

Having demonstrated that our purification strategy worked efficiently and eliminated most background contaminants at the low expression levels obtained by targeting the *AAVS1* locus, we aimed to determine if proteins expressed from their natural chromosomal contexts could be isolated with high specificity as physiologically regulated endogenous complexes. We designed CRISPR/Cas9-based nucleases to cleave DNA at the vicinity of the stop codon of *EPC1* in order to stimulate homology-directed integration of the TAP tag using a donor molecule containing short homology arms (Figures 2.2A and 2.S2A). Following transfection of K562 cells with the nuclease and recombination donor, we readily detected the incorporation of the tag in the pool of cells by PCR (Figure 2.S3). Targeted clones, isolated by limiting dilution in absence of any selection, were observed at a frequency of 6% (10/165) and accurate gene modification was confirmed by western blot analysis and sequencing (Figures 2.2B, 2C and S3). We did not obtain homozygous clones for this gene, but we note that PCR analysis suggests that three copies of the locus are present in K562 cells (Figure 2.S3). Comparison of the EPC1-tag protein levels expressed from the *AAVS1* locus versus the endogenous gene revealed an approximately 2.5 fold overexpression in the former case (Figures 2.2G and 2.S3). We performed side-by-side TAP from an endogenously tagged EPC1 cell line, and from a clone targeted at *AAVS1*, and observed matching banding patterns on silver stained gels (Figure 2.S3). Mass spectrometry analysis confirmed the complete coverage of the subunits when the complex is purified from the endogenous locus (Table 2.S1). To confirm these observations, we used a similar approach to perform a reciprocal purification of the complex by tagging the endogenous *EP400* gene at its C-terminus (Figures 2.2D and 2.S2B). The efficiency of targeting in this case was 21% (13/61, including 2 homozygous clones). For the purification, a homozygous clone expressing tagged EP400 was selected (Figures 2.2E, 2.2F and 2.S3). This clone expressed approximately 2 fold less

protein than the one used in the *AAVS1* purification (Figures 2.2G and 2.S3). Both complexes could be purified to near homogeneity and displayed strong H4/H2A-specific HAT activity towards nucleosomes (Figures 2.2H and 2.2I; Table 2.S1). Since MBTD1 was reproducibly detected in these preparations, we performed reciprocal tagging to confirm its stable association with NuA4. CRISPR/Cas9-mediated integration of the TAP tag at its C-terminus was efficient reaching 26 % (20/78, including 6 homozygous clones) of positive clones (Figures 2.S2C and data not shown). Purification of MBTD1 using a homozygote clone confirmed its association with NuA4 (Figures 2.2J and 2.2K). Thus, our approach led to the most complete characterization of native NuA4 components to date. Not only we were able to conclusively demonstrate that EPC1 and EP400 exclusively associate with the complex, but we also identified MBTD1 as novel subunit. These data demonstrate that highly efficient purification of native protein complexes is achievable with minimal chromosomal sequence disruption and preservation of endogenous physiological regulation of the bait protein.

2.2.4 TALEN-Enabled Purification of the Endogenous Polycomb Repressive Complex 2

To test the generality of the TAP procedure, we undertook the purification of the enhancer of zeste homolog 2 (EZH2), the catalytic subunit of the polycomb repressive complex 2 (PRC2) responsible for the di- and tri-methylation of histone H3 at lysine 27 (H3K27me_{2/3}), a histone mark that correlates with silent or poorly transcribed genomic regions (Margueron and Reinberg, 2011). EZH2 is a critical regulator of development, controls stem cells pluripotency and differentiation, its deregulation being at the center of novel therapeutic strategies for a variety of cancers (Plass et al., 2013). First, EZH2 with an N-terminal TAP tag was targeted to the *AAVS1* locus (Figure 2.1A). Next, we replaced the natural ATG of EZH2 with the TAP tag via homology-directed repair at the chromosomal locus using a pair of TAL effector nucleases (TALENs) (Figures 2.3A and 2.S4) (Reyon et al., 2012). Twenty one percent (20/96, including 6 homozygous clones) of screened clones had a tagged allele as assessed by PCR, western blotting and sequencing (Figures 2.3B, 2.3C and 2.S4). A homozygote clone expressing exclusively the tagged EZH2 protein was selected for TAP. Interestingly, in this context, the endogenous locus drives higher protein expression levels as compared to the ectopically expressed protein from the *AAVS1* locus (Figure 2.S4). The complexes were isolated from nuclear extracts prepared from both cell lines and analyzed by SDS-PAGE and silver staining. Both preparations appeared similar as a specific protein band pattern could be clearly identified from the gels when compared to the mock fractions (Figures 2.3D and 2.3E). Co-purified proteins were analyzed by mass spectrometry leading to the unambiguous identification of all known

PRC2 components (Table 2.S2) (Margueron and Reinberg, 2011). Sub-stoichiometric interactions between PRC2 and the EHMT1/2 complex, a H3K9 mono- and di-methyltransferase, were also detected in the TALEN-derived clone (Figure 2.3F and Table 2.S2). The interaction is not mediated by co-localization/co-purification on DNA since it is not sensitive to treatment with benzonase (Figure 2.S4). This association uncovers a direct physical link that supports the concept of an H3K27me/H3K9me switch for the long-term repression of differentiation genes (Mozzetta et al., 2014). It also indicates that biallelic targeting of endogenous genes, leading to exclusive expression of the tagged bait protein in the cell, can reveal labile and important interactions. Lastly, the purified fractions contained robust enzymatic activity as determined by histone methyltransferase (HMT) assays (Figure 2.3G).

2.2.5 Interactions Between Endogenously Tagged Chromatin Modifying Complexes and Genomic DNA Regions

Chromatin Immunoprecipitation (ChIP) is a powerful technique used to investigate the interaction between proteins and DNA in the cell permitting to identify the genomic regions bound by a protein of interest. We tested if the endogenously tagged cell lines could be used for ChIP using the well-characterized anti-FLAG M2 antibody and analyzed the occupancy of tag-EZH2 and EPC1-tag to the *HOXA9* locus and to the *RPL36AL* ribosomal protein gene. We observed strong binding of EZH2 at *HOXA9*, a bona fide PRC2 target, and marginal enrichment at *RPL36AL* (Figure 2.3H). In contrast, EPC1 was specifically recruited to the highly transcribed *RPL36AL* gene, as expected for NuA4 (Figure 2.3H). The effectiveness of ChIP assays and genome-wide location analysis currently rely on validated antibodies to target proteins, which varies greatly. Thus, the use of a common tag added on endogenous proteins will greatly enhance reproducibility, and importantly, enable accurate comparison between different sets of factors in distinct growth conditions (Bradbury and Pluckthun, 2015; Venters et al., 2011).

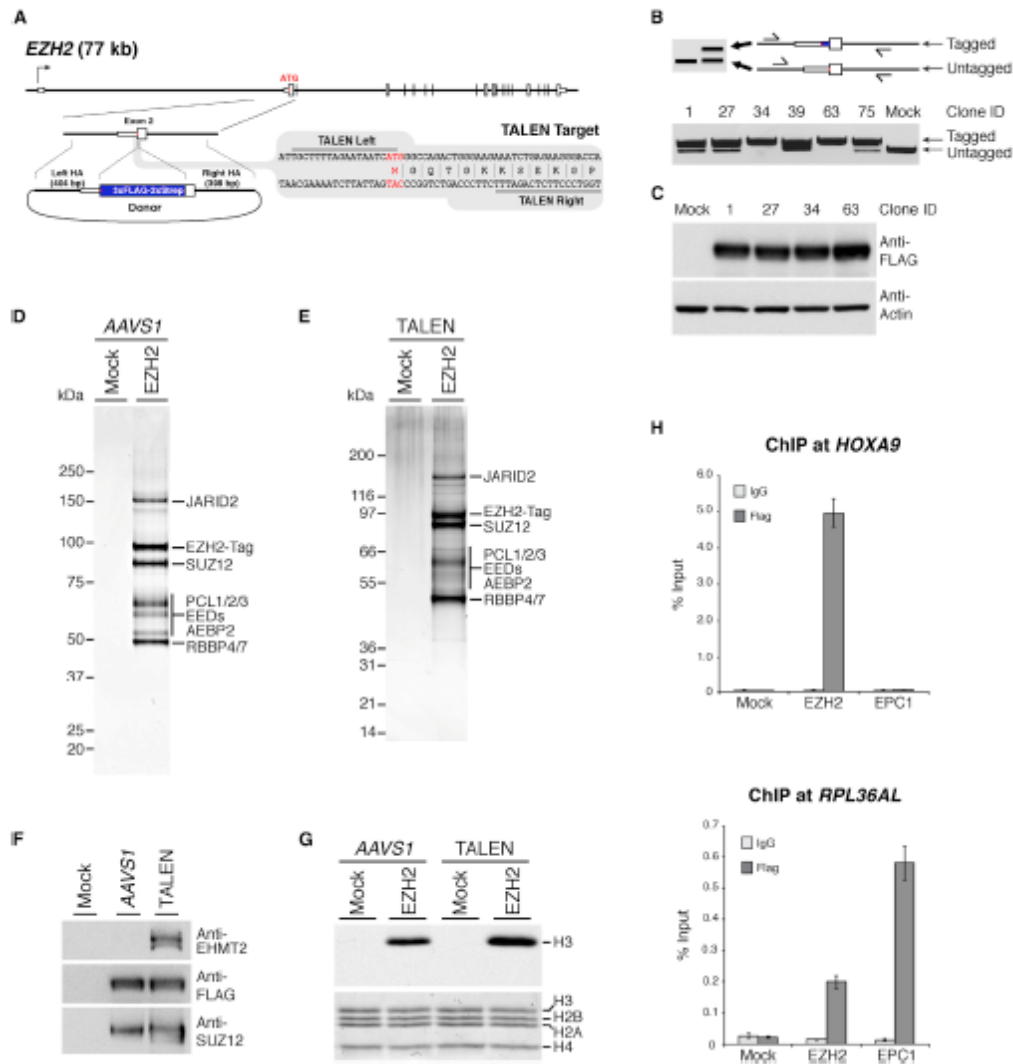


Figure 2.3. Tandem-Affinity Purification of the Native PRC2 Protein Complex

(A) Schematic of the *EZH2* locus, TALEN target site, and donor construct used to insert an affinity tag to the N-terminus of the EZH2 protein. Annotated are the positions of the start codon (ATG), the left and right TALEN target sites, and homology arms left and right (HA-L, HA-R). (B) Schematic and results of a PCR-based assay (Out-Out PCR) to detect targeted integration (TI) of the tag sequence in single-cell derived K562 clones obtained by limiting dilution following TALEN-driven gene targeting. Primers are located outside of the homology arms and are designed to yield a longer PCR product if the tag is inserted. (C) Western blots showing tag-EZH2 protein expression in K562 clones. Mock indicates cells treated with donor only. The FLAG M2 antibody was used to detect EZH2 and the actin antibody was used as a loading control. (D) Silver stained SDS-PAGE showing the purified EZH2 complex expressed from the *AAVS1* locus. K562 cells expressing the tag (Mock) and a clonal cell line ectopically expressing tag-EZH2. (E) Silver stained SDS-PAGE showing the purified EZH2 complex expressed from the endogenous locus. Wild-type K562 cells (Mock) and a clonal cell line expressing tag-EZH2 (#63). Proteins were identified from unfractionated protein samples and assigned to specific gel bands based on western blotting analysis and predicted molecular weights. (G) Western blots of selected PRC2 subunits

on purified fractions shown in D and E. (F) Autoradiogram showing the results of a HMT assay to determine the specificity of the EZH2 complex. Coomassie staining was used as a loading control for histones. (H) Binding of endogenously tagged EZH2 and EPC1 to target gene promoters as determined by ChIP-qPCR analysis. Values are expressed as % of input chromatin. Mean values and error bars indicate the range obtained in 2 independent experiments. See also Figures 2.S4.

2.2.6 Purification of Endogenous DNA Repair Complexes

To further exemplify the robustness of our strategy, we extended our studies to proteins involved in DNA repair. The Fanconi anemia (FA) core complex is a multisubunit ubiquitin ligase that initiates DNA repair of interstrand crosslinks (Walden and Deans, 2014). Based on the work of several groups, its subunit composition has been well established and the core was defined as containing FANCA, FANCB, FANCC, FANCE, FANCF, FANCG, FANCL, FAAP20, and FAAP100 (Walden and Deans, 2014). However, some variations in its architecture are observed suggesting that the complex is composed of sub-modules (Ali et al., 2012; Rajendra et al., 2014; Walden and Deans, 2014). We attempted to purify the FA core complex through the FANCF protein as it is suggested to act as a scaffolding subunit. We tagged the N-terminus of FANCF using the CRISPR/Cas9 double nicking strategy and selected a homozygote clone expressing exclusively the tagged FANCF protein for TAP (Ran et al., 2013) (Figures 2.4A-4C and 2.S5A). In this experiment, five percent (5/96, including 2 homozygous clones) of screened clones had a tagged allele. Our approach successfully resulted in the purification of a core complex that is highly similar to previously reported assemblies (Figure 2.4D and Table 2.S3) (Ali et al., 2012; Rajendra et al., 2014). In addition, subunits of the anchor complex (FANCM, FAAP24 and FAAP16) were detected with the core complex in cells under normal cycling conditions (Walden and Deans, 2014) (Table 2.S3).

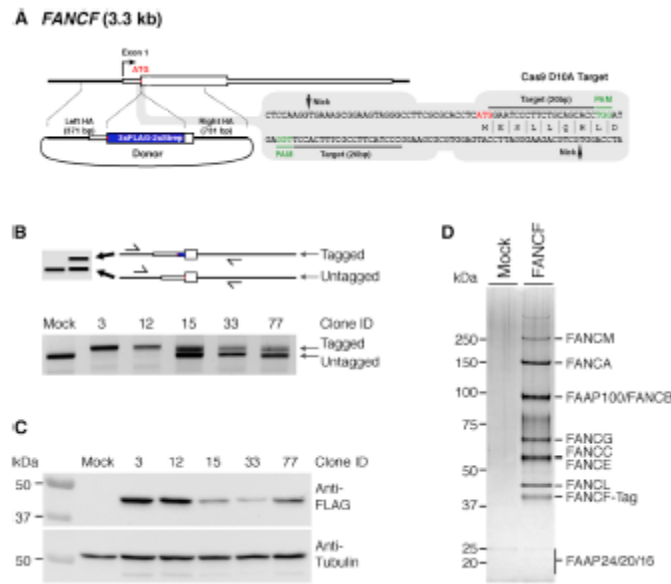


Figure 2.4. Tandem-Affinity Purification of Endogenously Tagged Fanconi Anemia Core Complex (A) Strategy for CRISPR/Cas9-driven insertion of the TAP tag to the N-terminus of the FANCF protein. Schematic of the *FANCF* locus, Cas9 double nickase target sites, and donor construct. The position of the start codon (ATG) and protospacer adjacent motifs (PAM) that specify nicking sites are shown. (B) Schematic and results of a PCR-based assay (out-out PCR) to detect targeted integration (TI) of the tag sequence in single-cell derived clones obtained by limiting dilution following CRISPR/Cas9-driven gene targeting. Primers are located outside of the homology arms and are designed to yield a longer PCR product if the tag is inserted. (C) Western blots showing tag-FANCF protein expression in K562 clones. Mock indicates cells treated with GFP expression vector. The FLAG M2 antibody was used to detect FANCF and the tubulin antibody was used as a loading control. (D) Silver stained SDS-PAGE showing the purified FANCF complex. Wild-type K562 cells (Mock) and clonal cell line expressing tag-FANCF. Proteins were identified from unfractionated protein samples and assigned to specific gel bands based predicted molecular weights. See also Figures 2.S5.

Next, we attempted to purify minichromosome maintenance complex component 8 (MCM8), a protein evolutionarily related to members of the MCM2-7 replicative helicase family (Maiorano et al., 2006). MCM8 has previously been shown to promote homologous recombination via its interaction with MCM9, but it is unknown if this association is exclusive. (Lutzmann et al., 2012; Nishimura et al., 2012; Park et al., 2013). C-terminal tagging of MCM8 clearly revealed the strict heterodimeric nature of the complex (Figures 2.5 and 2.S5B, 2.C, 2.D; Table 2.S4). Taken together, these findings establish the value of using nuclease-mediated endogenous gene tagging to refine the composition and enzymatic activities of protein complexes and highlight the robustness of our TAP strategy.

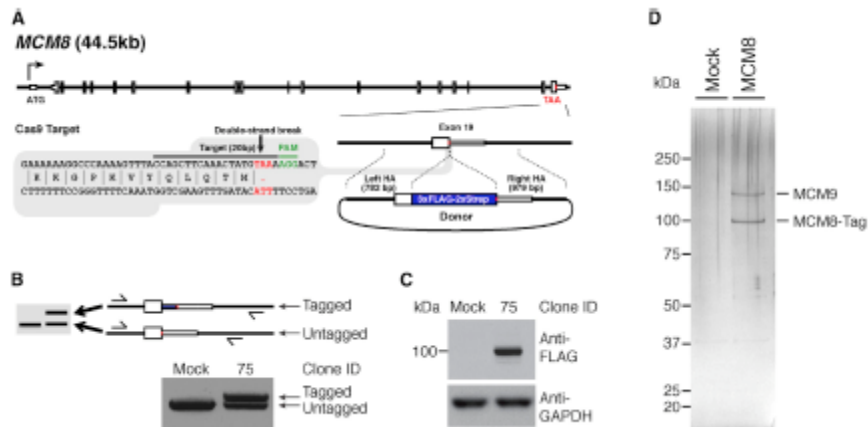


Figure 2.5. Tandem-Affinity Purification of Endogenously Tagged Minichromosome Maintenance Complex Component 8

(A) Strategy for CRISPR/Cas9-driven insertion of the TAP tag to the C-terminus of the MCM8 protein. Schematic of the *MCM8* locus, wild-type Cas9 target site, and donor construct. Annotated are the positions of the stop codon (TAA), the target site, and the protospacer adjacent motif (PAM) that specifies the cleavage site. (B) Schematic and results of a PCR-based assay (in-out PCR) to detect targeted integration (TI) of the tag sequence in single-cell derived clones obtained by limiting dilution following CRISPR/Cas9-driven gene targeting. In this particular case, one primer is located upstream of the left homology arm and one binds the right homology arm to yield a longer PCR product if the tag is inserted. (C) Western blots showing MCM8-tag protein expression in K562 clone #75. Mock indicates cells treated with donor and Cas9 nuclease in absence of gRNA. The FLAG M2 antibody was used to detect MCM8 and the GAPDH antibody was used as a loading control. (D) Silver stained SDS-PAGE showing the purified MCM8 complex. Wild-type K562 cells (Mock) and a clonal cell line expressing MCM8-tag (#75). Proteins were identified from unfractionated protein samples and assigned to specific gel bands based on predicted molecular weights. See also Figures 2.S5.

2.2.7 Towards High-Throughput Genome-Scale Purification of Native Endogenous Protein Complexes

The combined robustness of the endogenous targeting and purification methods lead us to test whether it was possible to purify the native protein complexes from the pool of cells shortly after transfection. If such a scheme were successful, it would offer the unique opportunity to easily and rapidly tag all human genes at their genomic location and isolate complexes. We transfected cells with the *EP400* CRISPR/Cas9 nuclease and donor vectors and expanded cells for 7 days before harvesting them for TAP purification (Figure 2.6A). Over the course of the experiment, we monitored the presence of targeted alleles in the cell population via PCR (Figures 2.6B and 2.6C). The EP400 complex could be efficiently purified from whole cell extracts with all its associated subunits (Figure 2.6D). Then, we confirmed this observation with the

EZH2 reagents and obtained an almost pure complex 10 days post transfection (Figures 2.6E-2.6G). It is critical to mention that no selection or cell sorting was used to enrich for tagged cells in the population before attempting the purifications. Thus, the requirement to generate genome-edited cell clones can be bypassed such that protein complexes can be directly isolated from gene-modified cell pools. These data constitute a blueprint for high-throughput genome-scale charting of physiological protein-protein interactions in human cells.

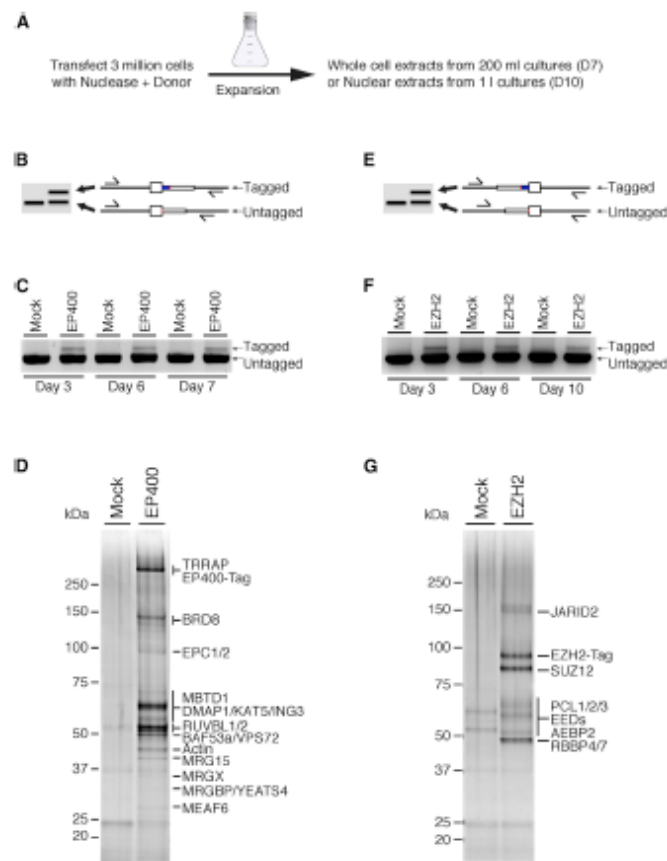


Figure 2.6. Efficient Complex Purification from Unselected Gene-Modified Cell Pools

(A) Timeline of experiment. (B) Schematic of a PCR-based assay (out-out PCR) to detect targeted integration (TI) of the tag sequence at the C-terminus of EP400. Primers are located outside of the homology arms and are designed to yield a longer PCR product if the tag is inserted. (C) Results of a out-out PCR assay conducted on genomic DNA from K562 cells transfected with (i) EGFP expression vector and EP400 donor (Mock) and (ii) wild-type Cas9 expression vector, gRNA #3 and EP400 donor (EP400). Cells were collected at various time points post-transfection. (D) Silver stained SDS-PAGE showing the purified EP400 complex isolated from the cell pool 7 days post transfection (E) Same as in A, but for the N-terminal tagging of EZH2. (F) Same as in B, but using the EZH2 TALENs and donor. (G) Silver stained SDS-PAGE showing the purified EZH2 complex isolated from the cell pool 10 days post transfection.

Proteins were identified from unfractionated protein samples and assigned to specific gel bands based on western blotting analysis and predicted molecular weights.

2.3 Discussion

2.3.1 Uses and limitations of the AAVS1 safe harbor ectopic expression system

The methods described here offer unique advantages as compared to traditional approaches used to study protein complexes in metazoan cells. The purification strategy not only allows the identification of associated proteins by mass spectrometry, but the purity and yields of the preparations are sufficient to perform enzymatic and mechanistic studies *in vitro*. It is worth noting that gene targeting at *AAVS1* can be performed in any human cell lines since the nuclease target site is naturally occurring as compared to the Flp-In system that requires prior integration of a Flp Recombination Target (FRT) site into the genome. Biosafety issues associated with the use of lentiviral vectors (Biosafety level 2 containment) are also avoided. Thus, it offers greater flexibility of use than traditional ectopic expression systems used for proteomic analysis. Note that ZFNs, TALENs and CRISPR/Cas9 nucleases targeting *AAVS1* can be used interchangeably (Figure 2.S1) (Hockemeyer et al., 2009a; Hockemeyer et al., 2011; Mali et al., 2013). The generation of cell lines expressing near physiological levels of bait proteins using the *AAVS1* targeting system is straightforward and can be used to rapidly isolate a protein of interest and to perform reciprocal purifications in order to confirm the stable association of a subunit with a protein complex. It can also be used to generate panels of variants under isogenic settings and for the analysis of specific splicing isoforms. As an example, the long and short isoforms of *JADE1* regulate the presence of *ING4/5* tumor suppressor proteins in the *KAT7/HBO1* histone acetyltransferase complex (Figure 2.S6) (Saksouk et al., 2009). One can also contemplate using this system to test the function of several mutants in the background of a cellular gene knockout. This could be especially useful for the functional study of essential genes. In addition, it offers a surrogate to study protein fusions resulting from complex genomic rearrangements that cannot be modeled via genome editing currently. As these protein fusions are often “toxic” when expressed in cells, we established a single-vector autoregulated tet-on expression system permitting tightly controlled inducible expression of target proteins (Figure 2.S6). Of course, this system requires obtaining and subcloning the cDNA of interest, which could be troublesome for very large proteins. However, this does not seem to be a major limitation as we successfully purified the EP400 complex (400 kDa) and obtained highly purified 350 kDa Ataxia telangiectasia mutated (ATM) kinase, a critical activator of the DNA damage response that is notoriously challenging to purify (Figure 2.S6)

(Shiloh and Ziv, 2013). Importantly, the use of standard and characterized nucleases can minimize the risk of confounding results due to off target mutagenesis.

2.3.2 Advantages and limitations of endogenous tagging

Seamless tagging of genes at their natural chromosomal locations preserves the physiological regulation of the bait protein expression, and of its splicing variants. Since the epitope tag inserted is of very small size and is not linked to a drug resistance gene or other extraneous elements, natural 5' and 3' UTR are minimally perturbed and no sequence is lost. Cis-acting regulatory elements are maintained within (introns) and outside (promoters/enhancers) transcribed regions. Thus, native regulatory mechanisms of protein expression are retained and the impact of various stimuli that modulate isoform ratios and interactors can be more precisely studied. Current limitations linked to constitutive overexpression of bait proteins leading to higher rates of false positive and negative interactions are therefore avoided. As examples, our approach settled the score on the KAT5 and EP400 enzymatic activities, clearly establishing them as part of a single stable macromolecular assembly *in vivo*. Moreover, this approach led to the identification of MBTD1 as a novel subunit of NuA4. It also demonstrates a direct physical link, in solution, between H3K27 and H3K9 histone methyltransferases, an interaction previously suggested to occur only through colocalization on the genome during development (Alekseyenko et al., 2014). Histone and residue specificity of chromatin modifying enzymes has been marred on multiple occasions over the years by several conflicting and debated results in the literature. Still today, the specificity of many enzymes is up to interpretation. We feel that our approach using endogenous activities along with native substrates will lead to a more coherent picture helping us to better understand the dynamic nature of the epigenome during development and disease (Lalonde et al., 2014).

The wide availability of research reagents for CRISPR/Cas9 and TALENs greatly facilitates the design and construction of custom reagents. All nuclease-based reagents described here were obtained from the plasmid repository Addgene. We provide detailed examples of donor design (Figures 2.S2, 2.S4 and 2.S5) in order to facilitate the implementation and adaptation of the strategy to user-specific contexts. The use of short homology arms facilitates the construction of donor vectors as they can be synthesized as DNA fragments smaller than 1 kb in length. For sequences that are AT or GC rich, PCR-based amplification of the homology arms might be required. Potential problems can be encountered if highly repetitive elements are found in proximity of the ATG or STOP codons, in which cases, the length of the arms should be truncated to avoid the presence of repeats in the donor. However, this is not essential as the MCM8 donor described in this study contains repetitive elements and successful targeting was

achieved. Apart from strict biochemical considerations, one should take into account the structure of the gene, the various protein isoforms produced and adjacent genetic elements when choosing to tag either the 5' or 3' end of genes.

A sensible preoccupation with genome editing techniques is the possibility of off-target mutagenesis. In our experiments we used TALENs, wild-type Cas9 and Cas9 D10A (dual nickase) interchangeably and did not observe overt toxicity or loss of targeted cells. Continuing progress in the field aiming to increase the precision of genome editing should progressively decrease the risk of obtaining confounding results. However, we note that the targeting specificity for the TAP tag using circular DNA donors benefits from the fact that homology-directed repair (HDR) mechanisms are required for integration of donor sequences. Thus, random integration of the donor is minimal because there are no homologous sequences at these potential off-targets. Nevertheless, on-target mutagenesis via non-homologous end joining (NHEJ) can result in small insertions and deletions (indels) at the non-targeted allele and care should be taken to carefully genotype both tagged and untagged alleles in clonally-derived cells lines (see Figures 2.S3 and 2.S5 for examples). We note that it is possible to design the targeting strategy to minimize the potential impact of such mutagenic events (see Figures 2.S2, 2.S4 and 2.S5). In this study, we used clones with biallelic integrations of the TAP tag when possible. This has an additional advantage as all molecules of the bait proteins are tagged in the cell.

Lastly, our data suggest that high-throughput characterization of protein-protein interactions under physiological conditions is achievable since protein complexes can be efficiently purified from mixed cell populations containing only a fraction of tagged alleles (Figure 2.6). As genome-scale CRISPR-Cas9 knockout screening in human cells is now a reality (Shalem et al., 2014; Wang et al., 2014), it will be possible to adapt these methods to generate nucleases targeting either the N- or C-terminus of every human proteins. Thus, a genome-scale proteomic approach of endogenous human proteins using this strategy seems imminently feasible.

2.4 Acknowledgments

This study was supported by grants from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (RGPIN-2014-059680) to Y.D. and the Canadian Institutes of Health Research (MOP-64289) to J.C. Salary support for Y.D. was provided by the Fonds de la recherche du Québec-Santé (FRQS). J.C. holds a Canada Research Chair in Chromatin Biology and Molecular Epigenetics. We thank J. Laganière (Héma-Québec) and F. Urnov (Sangamo BioSciences) for helpful discussions, Marcus Wilson (U. of Toronto) and Nicolas Lacroix-Pepin for assistance with cloning. Protein identification by mass spectrometry was performed by the Proteomics Center at CHU de Québec Research Center.

2.5 Experimental procedures

2.5.1 Cell culture and transfection

K562 cells were obtained from the ATCC and maintained at 37 °C under 5% CO₂ in RPMI medium supplemented with 10% FBS, penicillin-streptomycin and GlutaMAX. When cultivated in Erlenmeyer or spinner flasks, 25 mM HEPES-NaOH pH 7.4 was added. Cells were transfected using the Amaxa 4D-Nucleofector (Lonza) per manufacturer's recommendations.

2.5.2 ZFN, TALEN, and CRISPR/Cas9 reagents

The *AAVS1*-targeting ZFNs and *EZH2* TALENs (Addgene #36775 and #36776) have been described (Hockemeyer et al., 2009a; Reyon et al., 2012). The CMV-driven human codon optimized Cas9 nuclease and nickase (Cas9 D10A) vectors (Addgene #41815 and #41816) and the U6-driven guide RNA (gRNA) vector to target human *AAVS1* (T2 target sequence; Addgene #41818) have been described (Mali et al., 2013). The two U6-driven guide RNA (gRNA) vectors to target human *FANCF* have been described (Tsai et al., 2014). All other gRNA expression vectors were built in the MLM3636 (Addgene #43860) backbone. Target sequences for *EPC1* (GTGACGTAGCTTCCTCCGAG), *EP400* (TGCCCTGACTACTGGCACGG), *MBTD1* (ATCAAACAAGAGCCATGAGG) and *MCM8* (CCAGCTTCAAACCTATGTAAA) were chosen according to a web-based CRISPR design tool (Hsu et al., 2013). The DNA sequence for the gRNA for *EP400*, *MBTD1* and *MCM8* were modified at position 1 to encode a 'G' due to the transcription initiation requirement of the human U6 promoter. When present on a nuclease construct, FLAG epitopes were removed by subcloning.

2.5.3 Construction of plasmid donors for recombination

The AAVS1-TAP tagging plasmid (Addgene #68375) was assembled in the AAVS1 SA-2A-puro-pA vector (Hockemeyer et al., 2009a) by inserting a synthetic DNA fragment containing a SV40 late polyadenylation sequence, *hPGK1* promoter and TAP tag sequence in between the puromycin resistance gene and the BGH polyadenylation site. The donor plasmids for tagging *EPC1*, *EP400*, *MBTD1*, *EZH2* and *FANCF* were synthesized as gBlocks gene fragments (Integrated DNA Technologies) and assembled using Zero Blunt TOPO cloning kit (Life Technologies) or cloned by restriction into pUC19. The homology arms for the MCM8 donor plasmid were amplified by PCR from K562 genomic DNA.

2.5.4 Targeted integration to the AAVS1 locus

One millions cells were transfected with 1 µg of ZFN expression vector and 4 µg of donor constructs. Simultaneous selection and cloning was performed for 10 days in methylcellulose-based semi-solid RPMI medium supplemented with 0.25 µg/ml puromycin starting 3 days post transfection. Clones were picked and expanded in 96 wells for 3 days and transferred to 12 wells plates for another 3 days before cells were harvested for western blot.

2.5.5 CRISPR/Cas9 and TALEN-driven targeted integration

For targeting using the CRISPR/Cas9 system, one million cells were transfected with 2 µg of gRNA plasmid, 2 µg of Cas9 vector and 4 µg of donor. For TALEN-driven integration, 2.5 µg of each vector and 4 µg of donor were transfected. Limiting dilution cloning was performed 3 days post transfection and targeted clones were identified via out-out PCR. For the experiments shown in Figure 2.6, 3 million cells were transfected at the same DNA ratios and the cells were cultivated in 10 ml of RPMI media in a T-75 flask for 3 days. The cells were then diluted to 2E5 / ml and grown in Erlenmeyer flasks with agitation until they reached a density of 1E6 / ml. Under these conditions we typically obtained 2E8 cells (200 ml culture at saturation) 7 days post transfection and 1E9 cells (1 l culture at saturation) 10 days post transfection.

2.5.6 Tandem affinity purification (Guruharsha et al.)

Typically, nuclear extracts (Abmayr et al., 2006) were prepared from 1E9 to 3E9 cells (1 l to 3 l cultures at saturation), adjusted to 0.1% Tween-20 and ultracentrifuged at 100 000 x g for 45 min. Extracts were precleared with 300 µl of Sepharose CL-6B (Sigma), then 250 µl of anti-FLAG M2 affinity resin (Sigma) was added for 2 h at 4°C. The beads were then washed in Poly-Prep columns (Bio-Rad) with 40 column volumes (Gorynia et al.) of buffer # 1 (20 mM HEPES-KOH pH 7.9, 10 % glycerol, 300 mM KCl, 0.1% Tween 20, 1 mM DTT, 1X Halt protease and phosphatase inhibitor cocktail without EDTA (Pierce)) followed by 40 CV of buffer # 2 (20 mM HEPES-KOH pH 7.9, 10 % glycerol, 150 mM KCl, 0.1% Tween

20, 1 mM DTT, 1X Halt protease and phosphatase inhibitor cocktail without EDTA (Pierce)). Complexes were eluted with 5 CV of buffer # 2 supplemented with 150 µg/ml 3x FLAG peptide (Sigma) for 1 h at 4°C. Next, fractions were mixed with 125 µl Strep-Tactin sepharose (IBA) affinity matrix for 1 h at 4°C and the beads were washed with 40 CV of buffer # 2 in Poly-Prep columns (Bio-Rad). Complexes were eluted in 2 fractions with 4 CV of buffer # 2 supplemented with 2.5 mM D-biotin, flash frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C. Typically, 15 µl of the first elution (3% of total) loaded on Bolt or NuPAGE 4–12% Bis-Tris gels (life technologies) and analyzed by silver staining. For purifications from whole cell extracts (WCE), cells were washed twice with PBS and lysed in buffer A (20 mM HEPES-KOH pH 7.9, 10 % glycerol, 300 mM KCl, 0.1% IGEPAL CA-630, 1 mM DTT, 1X Halt protease and phosphatase inhibitor cocktail without EDTA (Pierce)) (ratio of 100 µl of lysis buffer per 1E6 cells) for 30 min at 4°C. Extracts were centrifuged for 30 min at 17 000 x g and the purifications were performed as described above.

2.5.7 HAT and HMT assay

TAP purified fractions were assayed for enzymatic activity on short oligonucleosomes isolated from HeLa S3 cells as described (Doyon et al., 2004; Musselman et al., 2012a).

2.6 Supplemental information

Supplemental figures 2.S1-S6 and tables 2S1-S4 may be found at:

<http://www.cell.com/action/showExperimentalProcedures?pii=S2211-1247%2815%2901020-7>

3. Chapitre 3: The TIP60 complex regulates bivalent chromatin recognition by 53BP1 through direct H4K20me binding and H2AK15 acetylation

Karine Jacquet^{1,2}, Amélie Fradet-Turcotte^{1,2,3}, Nikita Avvakumov^{1,2}, Jean-Philippe Lambert³, Céline Roques^{1,2}, Raj K. Pandita⁴, Eric Paquet^{1,2}, Pauline Herst^{1,2}, Anne-Claude Gingras^{3,5}, Tej K. Pandita⁴, Gaëlle Legube⁶, Yannick Doyon², Daniel Durocher^{3,5} and Jacques Côté^{1,2#}

¹St-Patrick Research Group in Basic Oncology, Laval University Cancer Research Center, Oncology Axis-CHU de Québec Research Center, Hôtel-Dieu de Québec, Quebec City QC, G1R 2J6 Canada

²Centre Hospitalier Universitaire de Québec Research Center and School of Medicine, Laval University, Quebec City, QC, Canada.

³The Lunenfeld-Tanenbaum Research Institute, Mount Sinai Hospital, Toronto ON, M5G 1X5 Canada

⁴Department of Radiation Oncology, The Houston Methodist Research Institute, Houston TX, 77030 USA

⁵Department of Molecular Genetics, University of Toronto, Toronto, ON, Canada

⁶LBCMCP, Centre de Biologie Intégrative (CBI), Université de Toulouse, CNRS, UPS, France

Corresponding author: (418) 525-4444 ext. 15535; e-mail: jacques.cote@crhdq.ulaval.ca

Running title: Common histone targets for 53BP1 and the TIP60 complex

Résumé

Le complexe acétyltransférase TIP60/hNuA4 est un régulateur clé de la stabilité et de l'expression du génome. Ici, nous avons identifié ici MBTD1 comme étant une nouvelle sous-unité stable du complexe qui nous a permis de clarifier la fonction de TIP60. En effet, MBTD1 possède un domaine de lecture de H4K20me1/2 et cible TIP60 à des loci spécifique au sein du génome. MBTD1 joue également un rôle dans la réparation des cassures double-brin de l'ADN par recombinaison homologue. De manière intéressante, 53BP1 un facteur clé de la jonction d'extrémité non-homologue lie la chromatine à travers H4K20me en combinaison avec H2AK15ub. De plus, il a été déjà proposé que l'acétylation de H4 par TIP60 régulerait sa liaison. Nos résultats indiquent que le complexe TIP60 est un régulateur les voies de réparation des CDB en partie via le ciblage des mêmes marques que 53BP1. En effet, l'ubiquitylation de H2AK15 par RNF168 inhibe l'acétylation de la chromatine par TIP60 alors que ce même résidu peut être acétylé par le complexe *in vivo* bloquant ainsi son ubiquitylation subséquente. Ensembles, nos données suggèrent donc un mécanisme complexe orchestré par le complexe TIP60 afin de réguler 53BP1 et le choix de voie de réparation à travers un ciblage et des modifications incompatibles de la chromatine.

Abstract

The NuA4/TIP60 acetyltransferase complex is a key regulator of genome expression and stability. Here, we identified MBTD1 as a new stable subunit of the complex and gleaned intriguing insights into TIP60's function. Harboring a histone reader domain for H4K20me1/2, MBTD1 allows TIP60 to associate with specific gene promoters and to promote the repair of DNA double strand breaks by homologous recombination. Interestingly, the non-homologous end joining factor 53BP1 engages chromatin through simultaneous binding of H4K20me2 and H2AK15ub, and it was postulated that Tip60-dependent acetylation of H4 regulates this binding. Our findings now indicate that the TIP60 complex is a potent regulator of DNA damage repair pathways in part by targeting the same histone mark as 53BP1. In addition, deposition of H2AK15ub by RNF168 inhibits chromatin acetylation by TIP60, while this residue can be acetylated by TIP60 *in vivo*, blocking its ubiquitylation. Altogether, these results uncover an intricate mechanism orchestrated by the TIP60 complex, which regulates 53BP1-dependent repair pathway selection through incompatible bivalent binding and modification of chromatin.

3.1 Introduction

Histone post-translational modifications (PTM) act as key regulators of chromatin organization, mainly by serving as docking sites for chromatin-binding factors (Zentner and Henikoff, 2013). Acetylation of lysine residues also destabilizes the DNA-histone and histone-histone interactions, leading to a more open and dynamic chromatin organization (Steunou et al., 2014). It is catalyzed by lysine acetyltransferases such as the mammalian NuA4/TIP60 complex, a 1.5 MDa multiprotein platform of at least 16 subunits, highly conserved from yeast to human (Steunou et al., 2014). *In vivo*, TIP60's major acetylation targets are lysines (K) 5, 8 and 12 on nucleosomal H4, H2AK5, histone variants H2AZ and H2AX, as well as non-histone substrates such as p53 (Steunou et al., 2014). The TIP60 complex is a key regulator of cell homeostasis, response to stress, as well as maintenance and renewal of stem cells (Avvakumov and Cote, 2007). It functions as an activator of transcription and is implicated in the regulation of key tumor suppressors and oncogenes such as p53, Rb and Myc (Avvakumov and Cote, 2007; Jeong et al., 2011; Kim et al., 2010; Ravens et al., 2015). Notably, Tip60/KAT5 is a haplo-insufficient tumor suppressor gene frequently mutated or deregulated in cancer (Voss and Thomas, 2009).

The NuA4/TIP60 complex also plays a key part in repair of DNA double strand breaks (DSB) (Rossetto et al., 2010). This type of DNA damage is particularly harmful as it can lead to genomic instability and loss of genetic material. Phosphorylation of Ser139 on the H2AX variant (γ -H2AX) that occurs in response to DSB initiates a cascade of signaling events and serves as a platform for recruitment of DNA repair mediators (Soria et al., 2012). Components of the NuA4/TIP60 complex are also rapidly recruited to DSB to acetylate H4, H2A and H2AX, thereby facilitating chromatin opening (Courilleau et al., 2012; Rossetto et al., 2010; Soria et al., 2012; Xu et al., 2010). Additionally, the Tip60/KAT5 acetyltransferase has been implicated in DNA damage signaling via direct acetylation and activation of ATM and inhibition of 53BP1 binding to damaged chromatin (Dantuma and van Attikum, 2016; Panier and Boulton, 2014; Tang et al., 2013). Finally, acetylation of γ -H2AX by TIP60 has been proposed to facilitate chromatin dynamics during and after DNA repair (Soria et al., 2012).

In higher eukaryotes, DSB are primarily repaired by one of two key pathways: non-homologous end joining (NHEJ) based on the direct re-ligation of the DNA ends, and homologous recombination (HR), in which a sister chromatid is used as a template to correct damaged DNA. These two pathways are regulated by 53BP1 – a keystone of the chromatin-induced signaling pathway and a key deciding factor between HR and NHEJ (Panier and Boulton, 2014). Recruitment of 53BP1 to DNA breaks inhibits HR by blocking resection of the DNA ends and directs the repair choice to NHEJ (Panier and Boulton, 2014).

53BP1 is a bivalent chromatin reader that binds H4K20 methylation and H2AK13/15 ubiquitylation via its tandem Tudor-UDR domain. These interactions are required both for recruitment of 53BP1 to DSB and for subsequent signaling (Fradet-Turcotte et al., 2013). Since methylation of H4K20 is widely distributed in the genome, competition for H4K20me2 by JMJD2A and L3MBTL1 has been proposed to block genome-wide 53BP1 recruitment (Panier and Boulton, 2014). By contrast, ubiquitylation of H2AK13/15 is actively mediated by E3 ubiquitin-ligases RNF8/168 in response to damage (Mattioli et al., 2012). Interestingly, recent studies directly implicate histone H4 acetylation in regulating 53BP1 during DNA damage response (DDR) and propose that TIP60-mediated H4K16ac impacts the ability of 53BP1 to bind neighboring H4K20me2 (Panier and Boulton, 2014).

In this study, we describe a newly identified stable subunit of the human NuA4/TIP60 acetyltransferase complex. MBTD1 contains MBT domains that recognize H4K20me and allow TIP60 to bind a number of genes, thus playing a role in regulation of transcription. Moreover, during DDR, MBTD1 regulates binding of 53BP1 at DNA lesions, likely through targeting the same H4K20me2 mark. In addition, we characterize an H2AK15 acetylation/ubiquitylation regulatory switch that further highlights the opposite functions of 53BP1 and TIP60 at DNA breaks. While RNF168-dependent H2AK15ub interferes with TIP60 binding to chromatin and blocks acetylation of H4, we demonstrate that H2AK15 can be acetylated by TIP60, inhibiting its ubiquitylation. We propose a new model in which TIP60 acts as a key regulator of DSB repair pathway choice, counterbalancing the role played by 53BP1 through incompatible bivalent interactions with chromatin near DNA lesions. Taken together, our results provide interesting insights into TIP60 function during transcription and DNA repair, and reveal a novel interplay between histone methylation, acetylation and ubiquitylation.

3.2 Experimental procedures

3.2.1 Establishment of isogenic cell lines expressing TIP60 components from the AAVS1 safe harbor and MBTD1 KO cell lines using CRISPR/Cas9

K562 cells were used to express components of the TIP60 complex from the AAVS1 safe harbor using ZFN-mediated insertion/recombination as described (Dalvai et al., 2015). MBTD1 KO was produced in U2OS cells using CRISPR/Cas9 also similar to what we previously described (Dalvai et al., 2015). Technical details and information about genome-wide expression analysis of MBTD1 KO cells are provided in supplemental experimental procedures.

3.2.2 Purification of native HAT complexes

Native TIP60 complexes were purified essentially as described before (Dalvai et al., 2015) with some modifications detailed in supplemental experimental procedures. Information about mass spectrometry analysis, antibodies and RNAi reagents is also provided in supplemental experimental procedures.

3.2.3 ChIP and ChIP-seq libraries

ChIP-seq experiments and analysis with K562 cells were performed as previously described (Lalonde et al., 2013) with minor modifications detailed in supplemental experimental procedures. For ChIP at a DSB induced in the *AAVS1* locus using ZFN, previously described 3xFLAG-tagged EPC1 and MBTD1 K562 cell lines produced by CRISPR-mediated tagging of endogenous genes were used (Dalvai et al., 2015). Briefly, cells were transfected by Amaxa 4D-Nucleofector (Lonza) with ZFN for 18h followed by FLAG ChIP as described above. For H2AK15ac and γ -H2AX ChIP at AsiSI-dependent DSB, the AID-DlvA Flag empty cell line was synchronized by double thymidine block and processed as described in (Aymard et al., 2014). ChIP conditions and primers are provided in supplemental experimental procedures.

3.2.4 In vitro and in vivo functional assays

Information about the purification of chromatin, histones, recombinant proteins, pull-downs, histone acetylation and ubiquitylation assays is provided in supplemental experimental procedures. Detailed information about the conditions used for immunofluorescence of γ -H2AX /53BP1 foci after cell irradiation, H2AK15ac/DAPI intensity analysis, reporter cell lines for HR/NHEJ measurements, COMET assay and cell cycle analysis is also provided in supplemental experimental procedures.

3.3 Results

3.3.1 MBTD1 is a new stable subunit of the human TIP60 complex

We utilized a site-specific zinc-finger nuclease (ZFN) to effect single copy integration of a cassette containing tagged cDNA at a characterized safe harbor locus in the *PPP1R12C* gene, an integration site for the Adeno-Associated Virus ((AAV) (Hockemeyer et al., 2009b) (figure 3.S1A)). Human K562 cell line stably expressing Tip60/KAT5 was established to purify the native TIP60 complex. The integrated cassette expresses Tip60/KAT5 with a 3xFLAG tag in fusion with a 2A peptide auto-cleavage site and the puromycin resistance gene, under the control of the human *PGK1* promoter and flanked by homology sequences for the targeted integration into the *AAVS1* site. The key feature of this system, other than the remarkable efficiency of integration and clonal selection, is its ability to stably express a gene at levels close to physiological, allowing large-scale purifications of different proteins under isogenic settings

(Dalvai et al., 2015). Purification from nuclear extracts with stringent FLAG immunoprecipitation and peptide elution was performed and analyzed by silver staining, mass spectrometry and western blotting (figure 3.1A, Table 3.S1). Interestingly, we detected significant amounts of the MBTD1 protein co-purifying along previously known subunits of the TIP60 complex. The same was observed when we similarly purified the TIP60 complex via the EPC1 subunit (figure 3.1B, Table 3.S1), and in other cell lines (HeLa and 293T, data not shown). Little is known about the function of MBTD1, other than the fact that it structurally resembles Drosophila Polycomb Group protein Sfmbt and mammalian L3MBTL1-4/SFMBT1-2, mostly due to its quadruple-repeat MBT (Malignant Brain Tumor) domain (Nady et al., 2012).

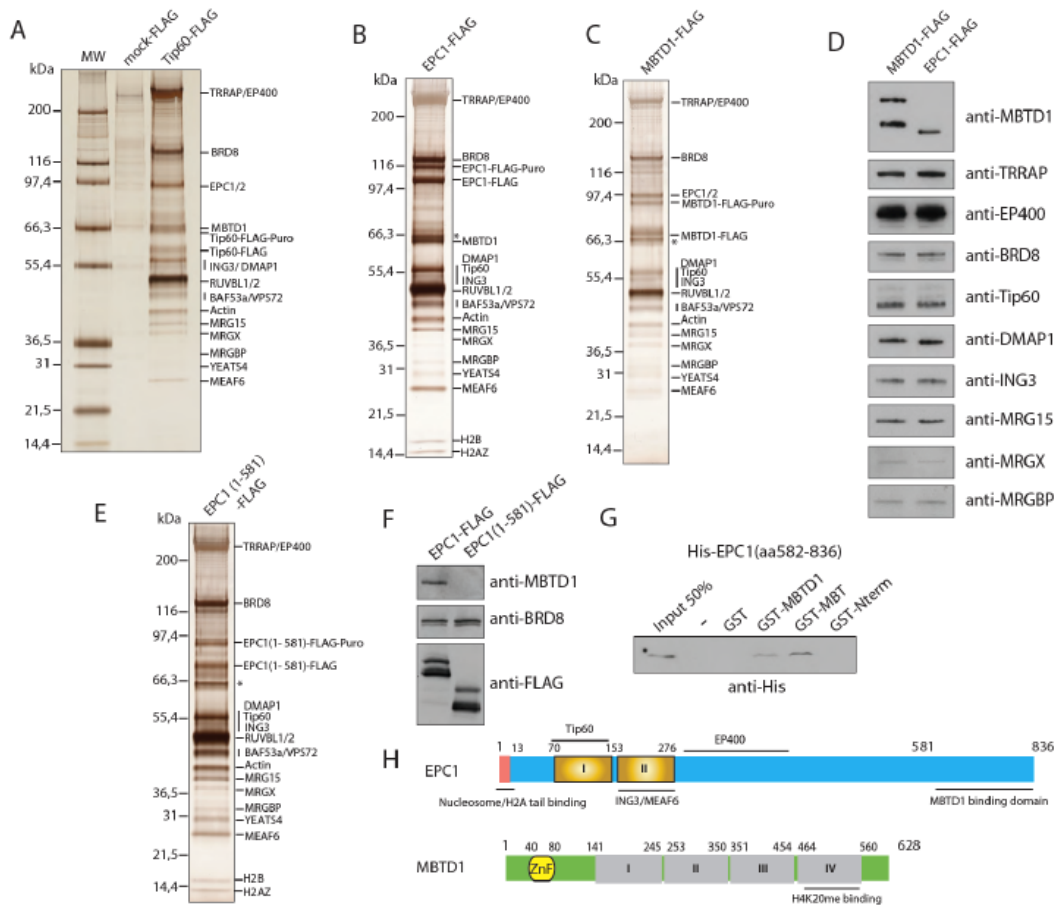


Figure 3.1: MBTD1 is a stable subunit of the human TIP60/NuA4 acetyltransferase complex

(A) Purification of native TIP60/NuA4 complex from K562 cells. The TIP60 complex was purified using a K562 cell line modified to stably express Tip60-3xFLAG (Fig. 3.S1A). Anti-FLAG immunoprecipitation was performed on nuclear extract, bound material was then eluted with 3xFLAG peptide and analyzed on 4-12% SDS-PAGE followed by silver staining. A mock purification was performed on a control cell line expressing an empty 3xFLAG tag. Subunits were identified by western blotting and mass spectrometry (Tables 3.S1-S2). **(B-C)** Purification of native TIP60 complexes from K562 cells expressing EPC1-3xFLAG or MBTD1-3xFLAG (as in (A)) (*non-specific band). **(D)** Purified complexes from (B) and (C) were analyzed by western blot with the indicated antibodies to confirm the equivalent presence of known

subunits of the TIP60 complex. The doublet appearing with the anti-MBTD1 antibody in the MBTD1-FLAG purification corresponds to inefficient self-cleaving peptide to remove the puromycin resistance portion of the tagged protein (also identified in (A-C)). (E) Purification of the TIP60 complex from a cell line expressing a truncated EPC1(1-581)-3xFLAG protein and analyzed as in (A). (F) MBTD1 association to TIP60 depends on EPC1 C-terminus. Western blot analysis of EPC1(1-581)-3xFLAG and EPC1-3xFLAG purifications. (G) MBTD1 directly interacts with EPC1 C-terminus through its MBT domains. Western blot analysis of GST pulldowns using EPC1 C-terminus (aa582 to 836) incubated with the indicated MBTD1 fragments. (H) Schematic representation of EPC1 and MBTD1 functional domains and interactions.

To test the specific and stable association of this protein with the TIP60 complex, we established MBTD1-3xFLAG expression in the same isogenic background, purified the MBTD1 protein and performed similar analyses (figure 3.1C-D, Table 3.S2). These data clearly indicate that MBTD1 is exclusively associated with the same set of proteins as known TIP60 subunits. Remarkably, even histone H2AZ-H2B dimers were detected in the purified fraction, as they are involved in the histone exchange activity of the EP400/VPS72 subunits (Dalvai et al., 2015).

Thanks in part to a parallel study, we gained insights into the molecular determinants of MBTD1 association with the TIP60 complex. While studying functional domains of the EPC1 subunit based on oncogenic truncations and translocations (Avvakumov *et al.*, in preparation), we determined that MBTD1 associates with the complex through a direct interaction with EPC1. Purification of a truncated form of EPC1 (aa1-581) clearly demonstrated the normal association of all known TIP60 subunits but the specific complete loss of MBTD1 (figure 3.1E-F, Table 3.S1). To further support these results, we performed GST pulldown assays with recombinant proteins (figure 3.1G-H, 3.S1B). These experiments confirmed a direct interaction between the C-terminus of EPC1 and the four-MBT-domain region of MBTD1. Importantly, the presence of MBTD1 in the TIP60 complex was not found to be regulated by growth conditions or genotoxic stress, or to affect the HAT activity of the complex towards H4 and H2A on chromatin *in vitro* (figure 3.S1C-D).

3.3.2 MBTD1 regulates binding of the TIP60 complex to specific genes *in vivo*

Previous work on MBT domains in various proteins had shown their specificity for mono- and dimethylated lysine residues, particularly H4K20 (Nady et al., 2012). Specific analysis of the MBTD1 protein revealed a preference for H4K20me1/2 (Eryilmaz et al., 2009; Nady et al., 2012), suggesting that this subunit could modulate binding of the TIP60 complex to chromatin. To address this, we first performed peptide pulldown experiments with purified GST-tagged 4MBT-repeat domain, and confirmed its robust affinity for mono- and di-methylated H4K20 (figure 3.2A). The strength of this binding is similar if not superior to that of the 53BP1 tandem Tudor domain, a well-established H4K20me-reader module, but

shows a distinct preference for mono- vs. di-methylated forms (Botuyan et al., 2006; Eryilmaz et al., 2009). To test the potential impact of MBTD1 histone reader module on TIP60 HAT activity, we used recombinant nucleosome core particles carrying different levels of methylated H4K20 residue. The kinetics of *in vitro* acetylation of nucleosomes containing unmethylated H4K20 by the TIP60 complex were indistinguishable between wild type and EPC1(1-581) (i.e. lacking MBTD1) purified complexes (figure 3.S2A). The same thing could be said about H4K20me1 nucleosomes, while slightly faster kinetics were detected with H4K20me2 nucleosomes in the absence of MBTD1. These results indicate that H4K20me recognition by MBTD1 has no strong effect on *in vitro* nucleosome acetylation by the TIP60 complex. Nevertheless, contribution by MBTD1 to the function of the TIP60 complex as a tumor suppressor is supported by the strong negative effect of its overexpression on the ability of U2OS cells to form colonies (figure 3.2B, 3.S2B), an effect slightly diminished when the predicted H4K20me-binding interface is mutated (Eryilmaz et al., 2009).

To study MBTD1 function *in vivo*, we analyzed its genome-wide location along with that of other components of the TIP60 complex. We used the different isogenic K562 cell lines to perform ChIP-seq experiments with an anti-Flag antibody, allowing standardized conditions. As implied by the complex purification data, we observed that EPC1, Tip60/KAT5 and MBTD1 significantly colocalized at the transcription start sites (TSS) of several active genes. As reported previously in yeast (Rossetto et al., 2014), the NuA4/TIP60 complex is recruited to highly transcribed genes, such as those encoding ribosomal proteins, represented here by the *RPSA* gene (figure 3.2C).

To validate our genome-wide analyses of TIP60 localization, we focused our attention on a set of 368 chromosomal regions strongly bound by at least 3 subunits unique to the complex: EPC1, Tip60/KAT5 and the newly identified MBTD1 (figure S2C, Table 3.S3). Enrichment analyses on genes flanking the 368 regions indicated that the MBTD1-containing TIP60 complex is a positive regulator of transcription/protein expression, binds promoters regulated by Myc and its target genes are mostly involved in apoptosis, cell cycle regulation and hypoxia (figure 3.S2D-E). While a link to Myc targets is expected (Kim et al., 2010), the highest correlation is detected with the BRCA1 network of transcripts. In addition, genes encoding notable regulators of cell growth, including the Rb paralog RBL1/p107 and the KMT2E/MLL5 H3K4 methyltransferase, were also found to be tightly bound by the TIP60 complex (figure 3.S2F-G).

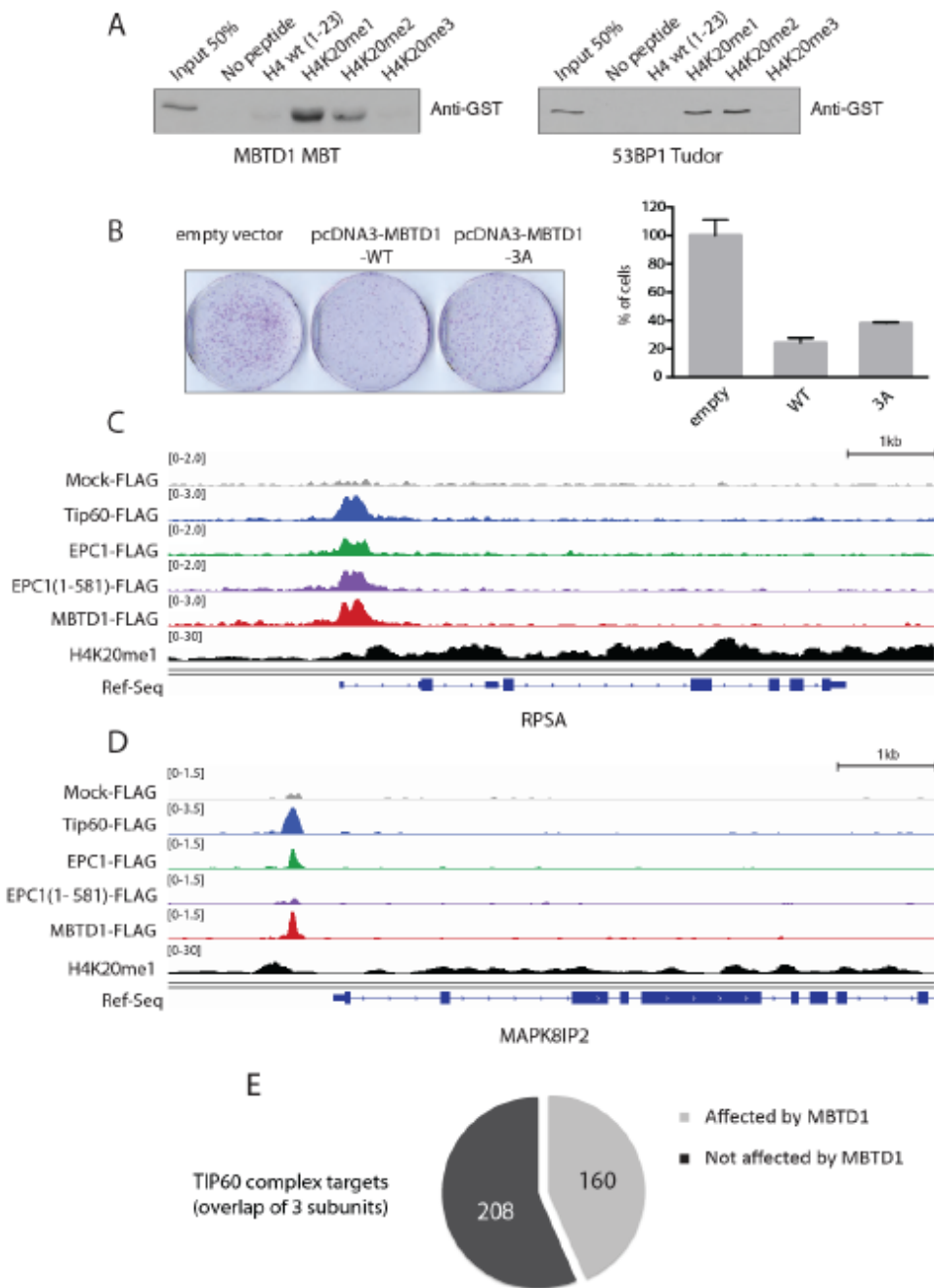


Figure 3.2: MBTD1 binds the H4K20me1/2 histone mark and colocalizes with the TIP60 complex at gene regulatory elements in the genome

(A) GST-tagged MBT domains of MBTD1 analyzed by peptide pulldown with the indicated biotinylated H4 peptides (aa1 to 23) (left panel); as positive control, the GST-tagged tandem Tudor domain of 53BP1 (aa1484 to 1603) is shown (right panel). Pulldowns were revealed by Western blotting with anti-GST. (B) Overexpression of MBTD1 suppresses cell growth by clonogenic assay. A MBTD1 triple-mutant in the fourth MBT domain is also shown. U2OS cells were transfected in triplicates with WT HA-MBTD1 or F526-W529-Y533A mutant (3A mutant) or empty vector for 48h (expression verified in fig. S2B). Hygromycin-resistant colonies were stained with Giemsa. (C) MBTD1, Tip60/KAT5 and EPC1 co-localize near the transcriptional start site (TSS) of the actively transcribed RPSA gene. Genome wide MBTD1 localization was analyzed after ChIP-seq and compared to data obtained in parallel with EPC1, EPC1 C-

terminal truncation (EPC1(1-581)) and Tip60/KAT5. Anti-FLAG chromatin immuno-precipitations were performed in tagged and mock K562 cell lines used in figure 1. The values correspond to reads per million of total reads (rpm). The H4K20me1 profile presented is from K562 cells in the Encode consortium dataset (direct reads). **(D)** MBTD1 is important for binding of the TIP60 complex on the promoter of the MAPK8IP2 gene. ChIP-seq data at the MAPK8IP2 gene is shown as an example where the EPC1(1-581) signal is lost compared to wild type EPC1, indicating a specific role of MBTD1 for the association of the TIP60 complex to this region. **(E)** MBTD1 impacts TIP60 complex localization at specific loci within the genome. Common genomic loci strongly bound by EPC1, Tip60/KAT5 and MBTD1 identified 368 high confidence targets of the TIP60 complex in K562 cells (Fig. S2C, Table S3). Comparison with the EPC1(1-581)-3xFLAG signals reveals that 160 out of these 368 *bone fide* TIP60 targets are affected by the absence of MBTD1 from the complex ($\log_{10}pvalue \geq 52.66$)(Fig. 3.S2D-H for additional analyses/loci).

The set of 368 regions robustly bound by the TIP60 complex was then analyzed by ChIP-seq using the EPC1(1-581) mutant in order to investigate the impact of MBTD1 on TIP60's ability to target and bind chromatin *in vivo* (figure 3.2D-E, S2H, Table 3.S3). Importantly, signals at 43% of TIP60 major targets are significantly affected in the absence of MBTD1, as exemplified by the *MAPK8IP2* promoter where we observed a complete absence of EPC1(1-581) signal compared to wild type protein. Overall, many of the genes affected by loss of MBTD1 from the complex encode proteins that function in the Aurora B kinase pathway (data not shown). In addition, we used CRISPR/Cas9 technology to produce MBTD1 knockout cells (U2OS, see below) and performed genome-wide expression analysis on three different clones compared to wild type cells (Tables S4-S7). Importantly, downregulated genes in the absence of MBTD1 tend to carry the H4K20me1 histone mark, to be bound by Myc and are similar to the ones affected by the loss of BRCA1. Collectively, our results demonstrate that MBTD1 is a stable near stoichiometric subunit of the TIP60 complex, with important contribution to its function in transcription and to proper association of the complex with a subset of genomic loci.

3.3.3 MBTD1 is a regulator of DNA damage response within the TIP60 complex

The NuA4/TIP60 complex is a well-established regulator of DNA damage response in organisms ranging from yeast to human (Dantuma and van Attikum, 2016; Rossetto et al., 2010). Since Tip60/KAT5 is directly recruited at DSB in human cells (Murr et al., 2006), we tested by ChIP if we could also detect MBTD1 recruitment at inducible breaks using ZFN targeting the *AAVS1* locus (Xu et al., 2010). As shown in figure 3A, we could detect appearance of TIP60 subunits MBTD1 and EPC1 close to the DNA break induced *in vivo* by the nuclease. This result was also reproduced using the AsiS1-DIvA inducible system (figure 3.S3B) (Aymard et al., 2014). Tip60/KAT5 had been previously reported to affect removal of γ -H2AX foci after DNA damage (Sharma et al., 2010; Soria et al., 2012), we performed comparable

experiments to determine whether depletion of MBTD1 could influence the kinetics of γ -H2AX foci formation and disappearance after cell irradiation. First, we analyzed knockdowns of two other important subunits of TIP60, EP400 and ING3, and saw a similar effect to what we had previously observed with Tip60 depletion (Sharma et al., 2010). In all three cases, loss of TIP60 subunits led to normal rapid appearance of γ -H2AX foci after irradiation, but a robust persistence of these foci for several hours after DNA damage compared to wild type cells (figure S3C). This is in clear contrast to knockdown of MOF/KAT8, which is responsible for the bulk of H4K16 acetylation and delays formation of γ -H2AX foci but not their removal (Sharma et al., 2010). In similar experiments, MBTD1 knockdown completely phenocopies depletion of Tip60, ING3 and EP400 in U2OS and 293 cells (figure 3.3B and 3.S3D). This persistence of γ -H2AX foci reflects an inability to destabilize them in the absence of TIP60 activity (Soria et al., 2012) but also an actual defect in DNA repair (Murr et al., 2006; Rossetto et al., 2010). Thus, we used two *in vivo* reporter systems for either HR or NHEJ in order to study the impact of Tip60/KAT5 and MBTD1 knockdowns on DSB repair (Sharma et al., 2010). MBTD1 knockdown, like previously reported for Tip60/KAT5 and PALB2, significantly decreased repair by HR (figure 3.3C).

In stark contrast, the complementary reporter system showed better repair by NHEJ in the absence of Tip60 or MBTD1 (figure 3.3D). These effects are not a simple consequence of changes in cell cycle distribution during depletion (figure 3.S3F). Furthermore, we performed a rescue experiment in the HR reporter system with siRNA-resistant expression of WT MBTD1 and the MBT4 triple mutant (figure 3.3E). WT MBTD1 can fully rescue the loss of repair by HR with siMBTD1 while the mutant also rescued but not as efficiently. Interestingly, overexpression of WT and mutant MBTD1 seemed to have dominant opposing effect on HR in the absence of knockdown. Altogether, these results indicate that MBTD1, like Tip60, is critical for the function of the TIP60 complex in facilitating repair of DSBs, specifically through HR (Courilleau et al., 2012; Murr et al., 2006; Tang et al., 2013).

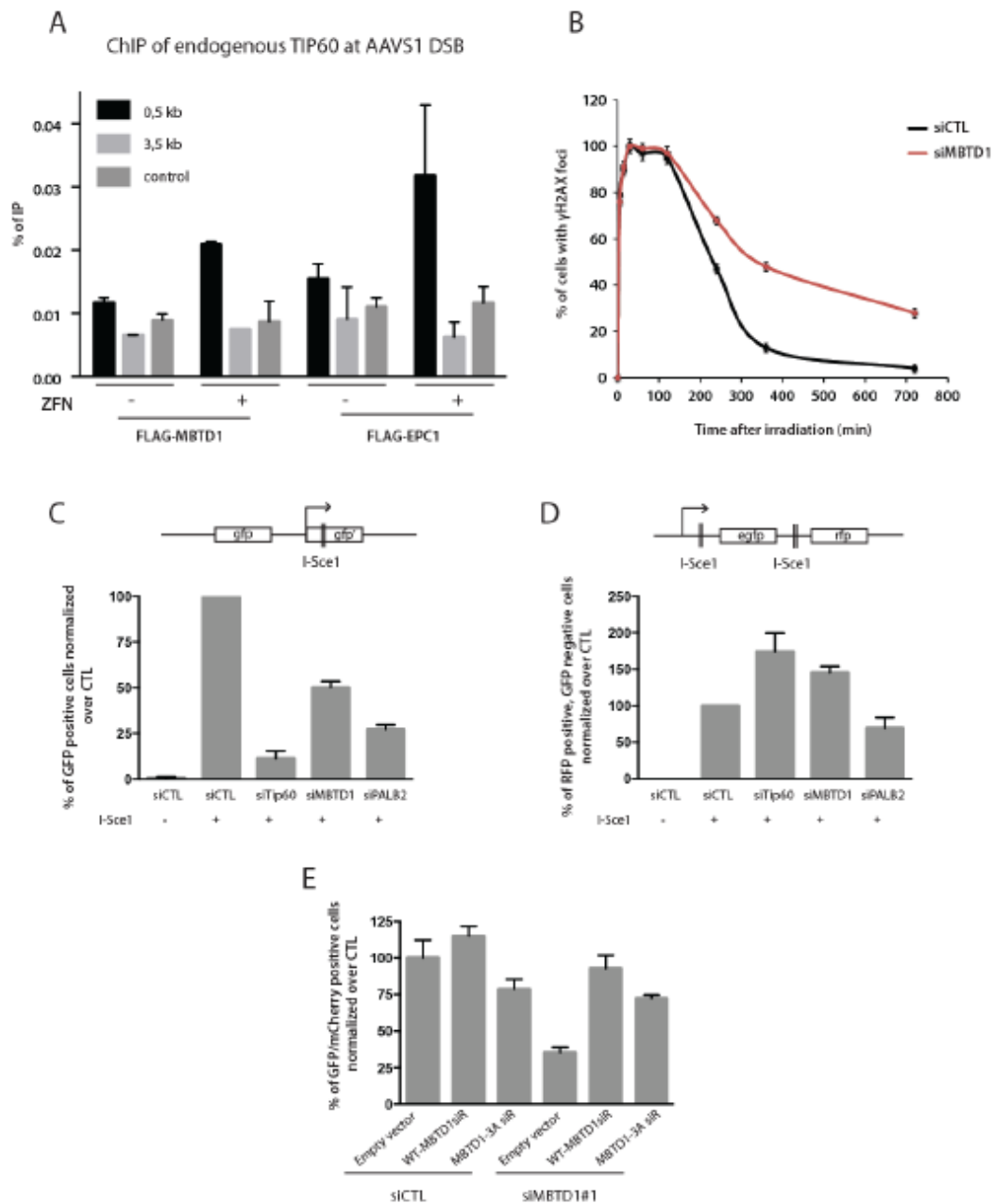


Figure 3.3: MBTD1 is implicated with TIP60 in the repair of DNA double strand breaks by homologous recombination

(A) MBTD1 is recruited at DNA double strand breaks. K562 cells expressing FLAG-tagged MBTD1 or EPC1 from the endogenous genes (Dalvai et al., 2015) were transfected with a vector expressing a zinc-finger nuclease (ZFN) targeting the *AAVS1* safe harbor followed 18h later by anti-FLAG ChIP. Primers for qPCR are located 0,5 and 3,5kb from the break as well as a negative control locus. Values represent % of input. Error bars are from two independently performed experiments (Fig. S3A for positive control). **(B)** Depletion of MBTD1 affects γ -H2AX foci dynamics after γ -radiations. 293 cells were transfected with the indicated siRNAs for 48h, treated with 2Gy γ -irradiations and processed for γ -H2AX immunofluorescence. Results are presented over time after irradiation as the percentage of cells with more than 4 γ -H2AX foci (mean \pm s.e.m, n=3). 100 cells were analyzed for each time-point. Similar results were obtained with shRNAs against other TIP60 subunits and in U2OS cells (Fig. S3C-D). **(C)** Measurement of homology

directed repair of an inducible I-Sce1 DSB in U2OS cells using an integrated the DR-GFP reporter (schematic on the top). Cells were transfected with the indicated siRNAs for 36h, infected with I-Sce1 adenovirus to induce DSB and then assessed 48h later by FACS analysis for GFP expression. Results represent the percentage of GFP positive cells normalized to the control siRNA, from 2 independent and representative experiments. **(D)** Measurement of I-Sce1 DSB repair by non-homologous end joining in U2OS cells using an integrated PC222/GFP-RFP reporter (schematic on the top). Cells were treated as in (C) and assessed by FACS for RFP and GFP expression. Results represent the percentage of cells that are RFP positive but GFP negative, normalized to the control siRNA, from 2 independent experiments. **(E)** Complementation assay in the DR-GFP reporter system (from C). Cells were transfected with CTL or MBTD1 siRNAs for 16h, then with pCAG-I-Sce1, pmCherry and siRNA-resistant MBTD1-expressing (WT or 3A mutant F526-W529-Y533A) or empty vectors and finally assessed 48h later by FACS for mCherry and GFP co-expression. Results represent the percentage of mCherry and GFP positive cells normalized to the control siRNA, from 2 independent experiments.

3.3.4 Tip60 and MBTD1 regulate the dynamics of 53BP1 binding near DNA damage

H4 acetylation and the TIP60 complex have been implicated in inhibition of 53BP1 binding to damaged chromatin (Tang et al., 2013). Additionally, both MBTD1 and 53BP1 have chromatin reader modules specific for H4K20me2. Given these facts, we logically speculated that MBTD1 could affect the dynamics of 53BP1 localization at DSBs and thus regulate DNA damage response. We first asked whether MBTD1 could efficiently compete with 53BP1 for binding to H4K20me2 *in vitro* (figure 3.4A). To test this, we saturated biotinylated H4K20me2 peptides with purified Tudor domain of 53BP1, bound these complexes to streptavidin resin, and then added increasing amounts of the purified MBT repeat domain of MBTD1. The MBTD1 reader module was able to partly displace 53BP1 Tudor domain from H4K20me2 peptides starting at a ratio of 1:1 between the two domains. This supports the hypothesis that MBTD1 within the TIP60 complex competes with 53BP1 for binding to H4K20me2-bearing chromatin near DNA breaks and helps repair pathway choice.

We then assessed the dynamics of 53BP1 foci formation and disappearance by performing immunofluorescence analyses after cell irradiation (figure 3.4B-E and 3.S4). We observed that knockdowns of Tip60/KAT5 or MBTD1 did not affect formation of 53BP1 foci after DNA damage, just as they had not affected appearance of γ -H2AX foci. However, depletion of Tip60/KAT5 and MBTD1 clearly delayed removal of 53BP1 foci, as evidenced by their persistence 5 hours after irradiation. These results suggest that binding of MBTD1 to the H4K20me histone mark does not appear to compete with 53BP1 during the latter's initial recruitment to DNA breaks. The same can be said about the TIP60 complex and its acetyltransferase activity toward the H4 tail. However, MBTD1/TIP60 do regulate persistence of 53BP1 after its initial recruitment, most likely during the critical stage when 53BP1 needs to be displaced to allow DNA end resection and HR. This is also probably linked to TIP60-dependent acetylation and removal of

g-H2AX to increase chromatin dynamics, allowing resection and loading of Rad51 (Courilleau et al., 2012; Murr et al., 2006; Soria et al., 2012).

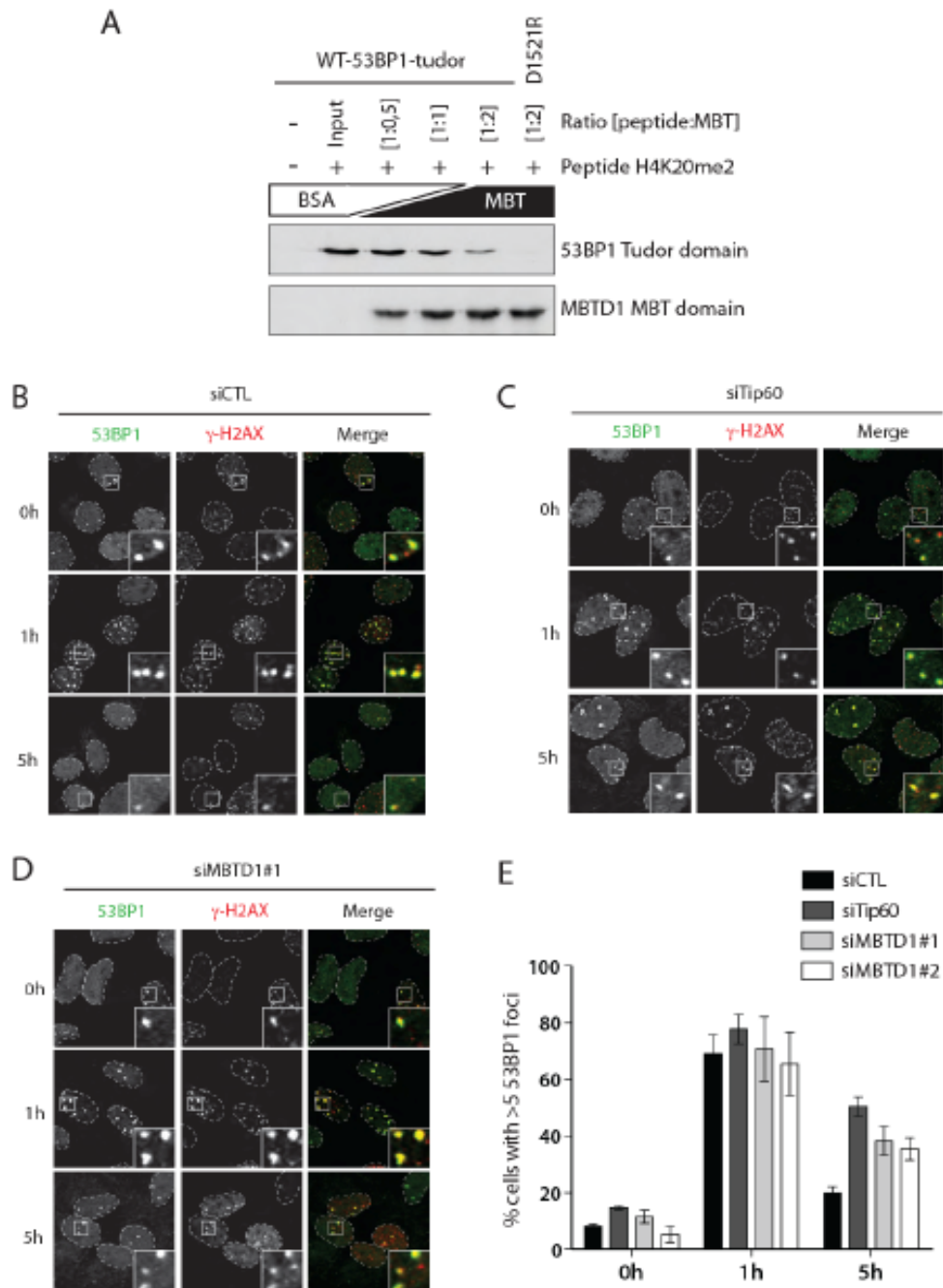


Figure 3.4: MBTD1 can displace 53BP1 from the H4K20me2 histone mark and affects the dynamics of 53BP1 foci after DNA damage

(A) MBTD1 can remove 53BP1 from H4K20me2 peptides. *In vitro* competition experiment between GST-tagged 53BP1 tandem Tudor domain and MBP-tagged MBTD1 MBT-repeat domain using H4K20me2 peptides (aa1-23). A two-fold excess of 53BP1 tandem Tudor domain (WT or mutant D1521R) was

incubated with biotinylated H4 peptide followed by the addition of increasing amounts of purified MBT-repeat domain of MBTD1 (or BSA). The level of binding by the tandem Tudor vs the MBT-repeat was measured by western blot on the peptide bound material using anti-GST or anti-MBP, respectively. **(B)** **(C)** Tip60/KAT5 affects the dynamics of 53BP1 foci after DNA damage. U2OS cells were transfected with control siRNA (B) or siTip60 (C) and irradiated (2Gy) 48h post-transfection. Cells were processed for γ -H2AX and 53BP1 immunofluorescence 0, 1 and 5h after irradiation. **(D)** MBTD1 knock down phenocopies Tip60 effect on the stability of 53BP1 foci. **(E)** Quantification of the dynamics of 53BP1 foci appearance/disappearance after irradiation in control conditions or when Tip60/MBTD1 are depleted. Data are presented as percentage of cells with more than five 53BP1 foci (mean \pm s.d, n=2). Two independent siRNAs for MBTD1 were used (Fig. 3.S3E and 3.S4).

To get a more definite answer on the interplay between MBTD1 and 53BP1 at DSB, we used CRISPR/Cas9 to produce MBTD1 KO cell lines (U2OS). We integrated by DSB-mediated HR stop codons/frameshift a few codons downstream of the ATG and isolated multiple homozygote KO clones confirmed by PCR-digestion and sequencing (figure 3.S5A-B). These clones were used in microarray expression experiments described above and the transcription profiles cluster together. Asynchronous cell populations show cell cycle profiles similar to wild type cells but release after thymidine block presents a slower progression through S/G2 (figure 3.S5C). Using these KO cells we then measured DNA repair efficiency after etoposide treatment by Comet assay (figure 3.5A). Results indicate that MBTD1 KO cells are significantly less efficient at repairing DNA breaks. Western blot analysis 0, 1 and 6h after etoposide treatment also shows significantly increased phosphorylation of RPA, and altered 53BP1 phosphorylation kinetics in MBTD1 KO cells (figure 3.S5D).

We then used these KO cell lines to assess the dynamics of 53BP1 foci formation and disappearance by immunofluorescence after cell irradiation (figure 3.5B-F). Cells lacking MBTD1 confirm the persistence of 53BP1 foci 5h after damage. Strikingly, they also clearly show more 53BP1 foci formed 1h post irradiation. These data argue that MBTD1 can block binding of 53BP1 to DNA damage sites. This concept was supported by rescue experiments performed in the MBTD1 KO cells (figure 3.5E-F). Expression of MBTD1 by transient transfection in the KO cell lines drastically brought down the number of 53BP1 foci detected both 1 and 5h after irradiation. Interestingly, it even lowered the numbers of foci in wild type cells, suggesting that MBTD1 over-expression can partly block binding of 53BP1 to DNA damage sites.

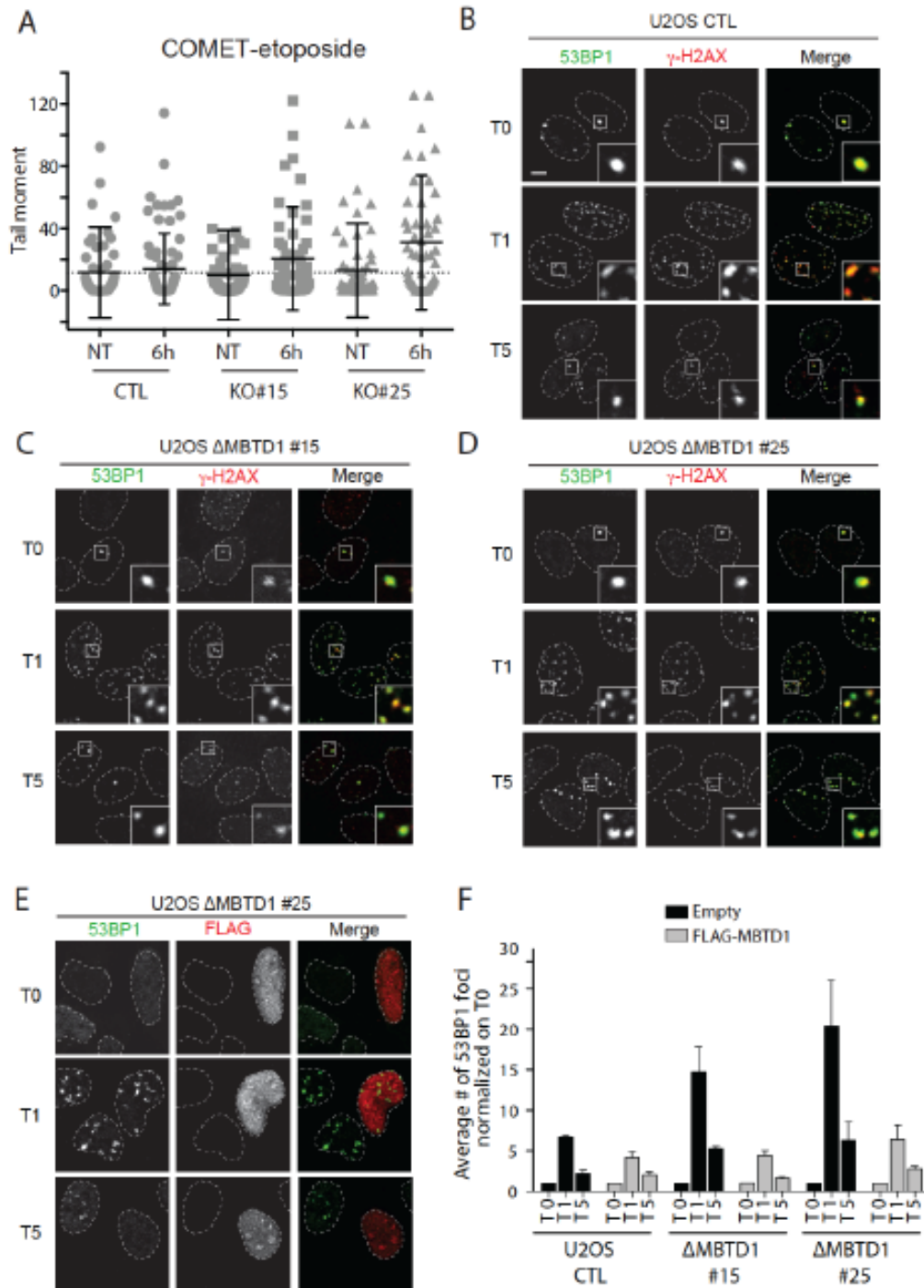


Figure 3.5: MBTD1 knockout cells show DNA repair deficiency and increased formation of 53BP1 foci after DNA damage

(A) Alkaline comet assay of MBTD1 WT or KO cells (U2OS), non-treated and 6h after etoposide treatment (50mM, 15min). One representative experiment on 2 different KO clones compared to WT ($n > 60$ per condition, mean \pm s.d., $p = 0.0006$). Tail moments 30min after treatment are similar in WT and KO cells with a mean around 100. (B) (C) (D) Dynamics of IR-induced 53BP1 foci in MBTD1 WT and KO cells. U2OS control cells (B) or KO clones # 15 (C) and #25 (D) were irradiated (2Gy) and processed for γ -H2AX and 53BP1 immunofluorescence 0, 1 and 5h after irradiation (scale bar is 5mm). (E) Re-

introduction of MBTD1 in KO cells restores 53BP1 foci dynamics. KO cells (is shown) were transfected with empty vector or FLAG-MBTD1, irradiated (2Gy) 24h post-transfection and processed for FLAG and 53BP1 immunofluorescence 0, 1 and 5h after irradiation. (F) Quantification of (B) (C) (D) and rescue experiment (E). At each time point, the number of 53BP1 foci was counted in at least 50 cells, averaged and normalized against the average number of foci counted in the same cell line at time 0 (T0 = 1). (means \pm s.e.m., n = 3; rescue: means \pm s.e.m., n \geq 2).

3.3.5 A switch between ubiquitylation and acetylation of H2AK15 can regulate the opposing functions of 53BP1 and TIP60

Since binding to H4K20me and acetylation of the H4 tail by the TIP60 complex can modulate 53BP1 binding to sites of DNA damage, we next turned our attention to the N-terminus of H2A as it is critical for 53BP1 association with chromatin. DNA damage-induced RNF168-dependent ubiquitylation of H2AK15 even supersedes H4K20me in *in vitro* chromatin binding assays with 53BP1's UDR domain (Fradet-Turcotte et al., 2013). Interestingly, the NuA4/TIP60 subunit EPC1 is required for nucleosome binding and H4 tail acetylation by the complex, through a direct interaction between the first 12 amino acids of EPC1 and the N-terminal tail of histone H2A (Chittuluru et al., 2011; Huang and Tan, 2013; Lalonde et al., 2013). Therefore, we speculated that RNF168-dependent ubiquitylation of H2AK15 has a direct impact on TIP60's ability to acetylate the H4 tail and modulate 53BP1 binding. To test this hypothesis, we used recombinant RNF168 to ubiquitylate purified native nucleosomes *in vitro* (figure 3.S6A). We then used these nucleosomes as a substrate for *in vitro* acetylation assays with purified TIP60 complex and observed that H2AK15 ubiquitylation selectively blocked acetylation (figure 3.6A). This inhibition is specific as it did not occur with another histone H4-specific HAT complex, HBO1-JADE1-ING4 (Lalonde et al., 2013), that targets the same residues but needs to bind the H3 tail instead of H2A in order to acetylate nucleosomes (Saksouk et al., 2009).

In parallel, since NuA4/TIP60 is known to acetylate the N-terminal tail of H2A on lysines 5 and 9 *in vitro* and *in vivo* (Steunou et al., 2014), it was interesting to verify whether H2AK15 itself could also be acetylated *in vivo* and whether TIP60 was involved. In addition, H2A residues targeted by RNF168 for ubiquitylation, K13 and K15, have also been found acetylated *in vivo* (Zheng et al., 2013b). Since lysine acetylation and ubiquitylation are mutually exclusive, we speculated that acetylation of H2AK15, potentially by the TIP60 complex, could be an additional mechanism of regulating 53BP1 binding to chromatin. To address this question, we first demonstrated that we could detect the acetylation of H2AK15 on native chromatin by western blotting with a specific antibody, and that incubation with the TIP60 complex and acetyl-CoA increases this signal, similar to what is seen with H4 acetylation (figure 3.S6B). To validate the H2AK15ac antibody, we then incubated wild type and mutant recombinant

nucleosomes with purified TIP60 complex and detected a specific H2AK15ac signal, which is completely lost when K15 is mutated (figure 3.6B). Importantly, a K13 mutant does not affect the TIP60-dependent signal detected by the antibody, while a H4Kc20me2 analog-bearing nucleosome does not stimulate it.

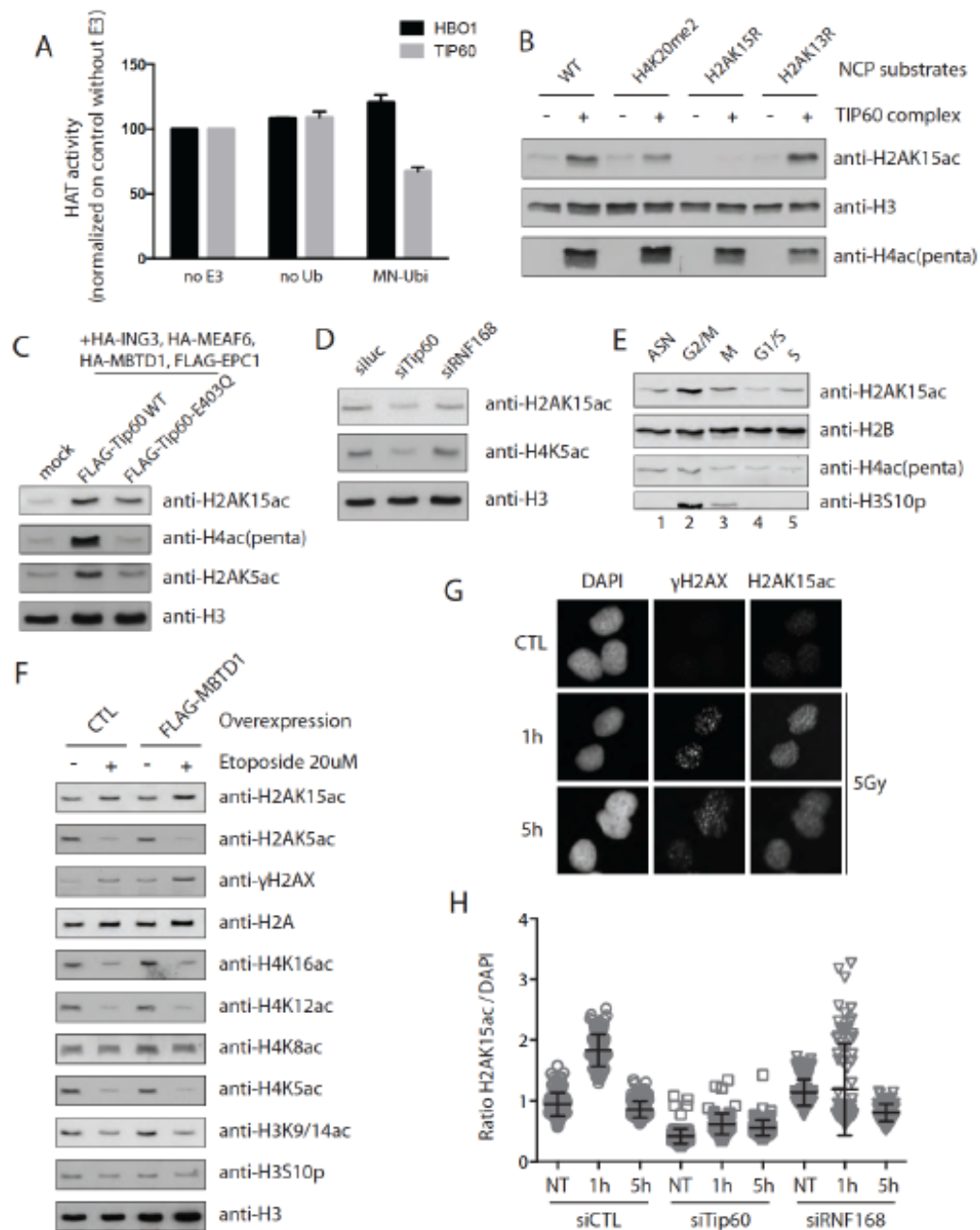


Figure 3.6: H2AK15 ubiquitylation by RNF168 versus acetylation by the TIP60 complex

(A) H2A ubiquitylation by RNF168 specifically inhibits TIP60-dependant acetylation of nucleosomes. Native mononucleosomes from HeLa cells were ubiquitylated *in vitro* with RNF168/E1/E2 (500ng; Fig. 3.S6A) and used as substrate in HAT assays with purified TIP60 complex. Another histone H4-specific

HAT complex, HBO1, was used as control. Values are normalized on the activity measured on control nucleosomes prepared without RNF168 (mean \pm s.d, n=2). **(B)** H2AK15 is acetylated by the TIP60 complex on nucleosomes *in vitro*; validation of H2AK15ac antibody specificity and interrelation with H4K20me2. Recombinant mononucleosomes (NCP) were used as substrates with purified TIP60 complex (EPC1-3xFLAG, Fig. 1). Wild type and mutant NCPs were used as well as one carrying H4Kc20me2 (methyl-lysine analog). **(C)** H2AK15 is a substrate of TIP60 *in vivo*. Chromatin was extracted from 293T cells transfected with a nucleosomal HAT sub-complex of TIP60 (piccolo-TIP60/NuA4) containing EPC1, ING3, MEAF6, MBTD1 and wild type Tip60 or the enzymatically dead E403Q mutant (Fig. S6C). H2AK15, H2AK5ac, H4ac and H3 signals were analyzed by western blotting. **(D)** Tip60 knockdown affects H2AK15ac level *in vivo*. Acid extracted histones from U2OS cells transfected with the indicated siRNAs for 48h were analyzed by western blotting for different histone modifications. **(E)** Acetylation of H2AK15 is regulated during the cell cycle. H2AK15 acetylation was analyzed by western blotting in U2OS cells synchronized by double-thymidine block and release (lanes 4 & 5; 0 and 2h, respectively) or thymidine-nocodazole block and release (lanes 2 & 3; 0 and 30 min, respectively). Asynchronous cells are shown as control (lane 1, ASN) and H3S10p signal is shown as G2/M marker (Fig. S6F for FACS). **(F)** H2AK15ac is differentially regulated in response to DNA damage. Acid extracted histones from 293T cells transfected with MBTD1 or control vector and treated or not with etoposide (20 μ M, 1h) were analyzed by western blotting for different histone modifications. **(G)** Nuclear H2AK15ac increases after DNA damage. U2OS cells were irradiated with 5 Gy, processed after 0, 1 or 5h for H2AK15ac and g-H2AX immunofluorescence and DAPI. **(H)** H2AK15ac increase upon DNA damage is dependent on Tip60. U2OS cells were irradiated with 5 Gy, 48h post transfection with the indicated siRNAs, and processed after 0, 1 or 5h for H2AK15ac immunofluorescence and DAPI. H2AK15ac signals were normalized on the DAPI signal in the same nuclei (n>80 per condition in duplicate, mean \pm s.d, p<0.0001).

In addition, overexpression *in vivo* (293T cells) of the nucleosomal HAT core of the TIP60 complex, termed piccolo-TIP60 (Tip60+EPC1+ING3), led to a dramatic increase in acetylation of H2AK15 as well as of other histone substrates (figure 3.6C and 3.S6C). More importantly, knockdown experiments using siRNAs show a clear decrease of H2AK15ac signal *in vivo* in the absence of Tip60, demonstrating that this is a new *bone fide* acetylation target of the complex (Fig. 6D). It was also interesting to test whether the presence of the MBTD1 subunit could contribute to acetylation of H2AK15 by TIP60. However, experiments using native purified complexes or analysis of MBTD1 KO cell lines did not show any variation in H2AK15 acetylation levels *in vitro* or *in vivo* (figure 3.S6D-E).

Interestingly, we analyzed H2AK15ac signals throughout the cell cycle and observed an enrichment of this mark in G2/M (figure 3.6E and 3.S6F). This potentially correlates with HR in early G2, as well as with the necessary release of 53BP1 from chromatin during mitosis (Orthwein et al., 2014). To test whether acetylation of H2AK15 could be linked to DNA damage response, we analyzed by western blotting bulk histones extracted 1hr after treatment with the DNA damaging agent etoposide. We observed a global deacetylation of histones H3 and H4, as well as of H2AK5 (figure 3.6F). In sharp contrast, H2AK15ac did not show such a decrease and instead appeared to increase slightly. In parallel, we performed immunofluorescence with the anti-H2AK15ac antibody on irradiated cells (figure 3.6G). The

images revealed a global increase of the H2AK15ac signal on chromatin after irradiation, but not particularly enriched near γ -H2AX foci. After normalizing the signals in each cell with the DAPI signal, it became apparent that H2AK15ac increase significantly through the nuclei 1h after irradiation and goes back to normal after 5h (Fig. 6H). These results indicate that acetylation of H2AK15 is specifically regulated in response to DNA damage, in a very distinct manner compared to other modifications. They also suggest that H2AK15ac could play a role in restricting H2AK15 ubiquitylation by RNF168 to the vicinity of the DNA breaks (Gudjonsson et al., 2012). siRNA experiments indicate that the DNA damage-induced H2AK15ac signal is also dependent on Tip60, but results after depletion of RNF168 are difficult to interpret (Fig. 3.6H). Altogether, these data implicate the TIP60 complex in an ubiquitylation/acetylation switch at H2AK15 that regulates the function of 53BP1 during DNA damage repair.

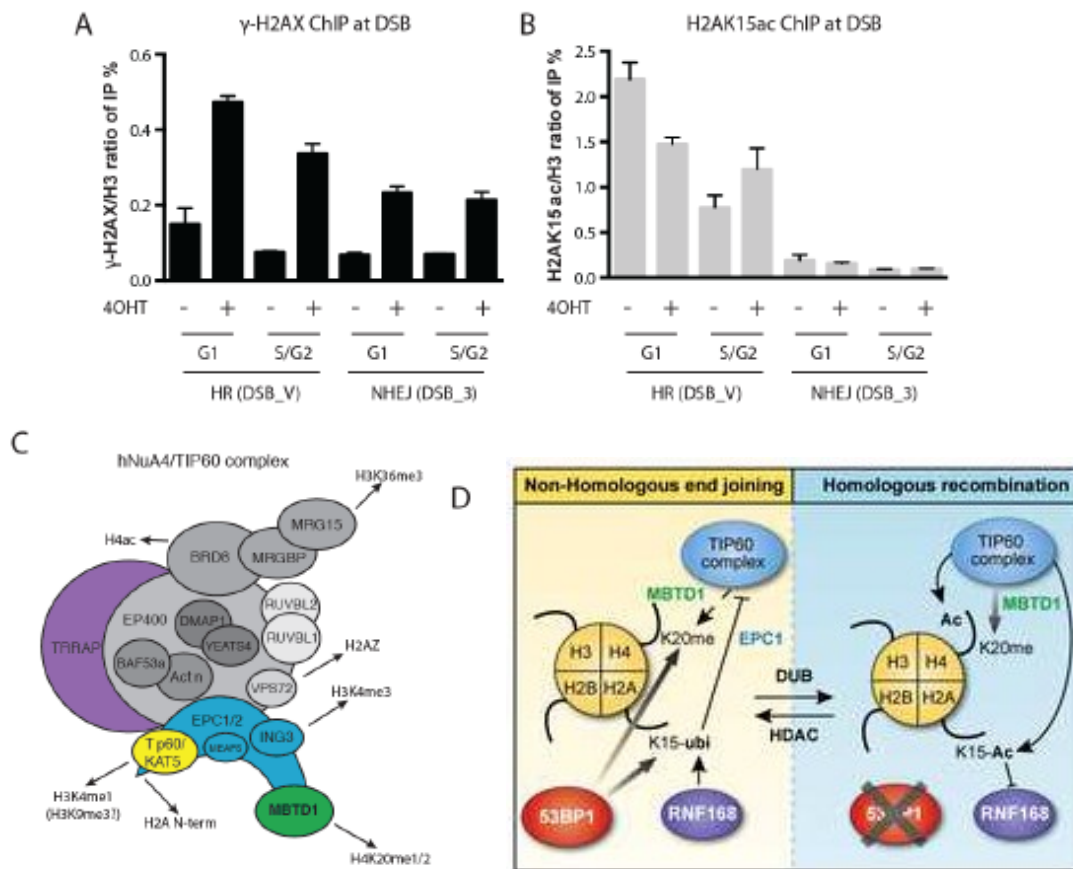


Figure 3.7: Acetylation of H2AK15 by TIP60 is linked to breaks preferentially repaired by HR during S/G2

(A)(B) H2AK15 is acetylated at pro-HR DSB in S/G2 cells. γ -H2AX and H2AK15ac ChIP experiments in AID-DivA cells (Aymard et al., 2014) after synchronization by double thymidine block and treatment with 4-OHT. Results are normalized for nucleosome occupancy over H3 IP % and represent a duplicate of independent experiments (Fig. S7B for other DSB sites). (C) Schematic representation of TIP60 complex

composition and its multiple histone mark reader subunits that regulate its interaction with chromatin. **(D)** Model for TIP60 regulation of 53BP1 during DSB repair pathway choice. TIP60 regulates DSB repair pathway selection by sharing common nucleosomal histone targets with 53BP1 on nucleosomes and by creating an ubiquitylation / acetylation switch at H2AK15. MBTD1 and 53BP1 both target H4K20me2 which promotes their binding to chromatin. RNF168 ubiquitylates H2AK15 in response to DNA damage to recruit 53BP1 on damaged chromatin. During NHEJ, H2AK15 ubiquitylation blocks TIP60 (EPC1) binding to the H2A tail and H4 acetylation, favoring 53BP1 retention at the break and inhibition of resection. On the other hand, TIP60 acetylates H2AK15 and therefore blocks ubiquitylation by RNF168 and 53BP1 binding. This can prevent promiscuous DNA damage-induced ubiquitylation of H2A throughout the genome, but also participates with H4K20me2 binding and H4 acetylation by TIP60/MBTD1 in disrupting 53BP1 occupancy on damaged chromatin to allow resection and repair by homologous recombination. The action of specific de-ubiquitinase (DUB) and deacetylases (KDAC) will be important to determine which interactions and modifications are favored on specific nucleosomes.

Since immunofluorescence showed a more general increase of nuclear H2AK15ac in response to DNA damage, we turned to ChIP analysis at inducible DNA breaks to question its dynamics near DSB. Using the ER-AsiS1 DivA system, we could investigate different DSB that were previously characterized to be preferentially repaired by HR or NHEJ (Aymard et al., 2014). Our first attempts on asynchronous cells did not show an increase of H2AK15ac at any DSB, but rather a slight decrease (figure 3.S7A). On the other hand, it was obvious that location prone to be repaired by HR were drastically more enriched in H2AK15ac even before DSB formation, suggesting a link with transcriptionally active chromatin. We then synchronized the cells in G1 or S/G2 before ChIPs to verify if phases of the cell cycle could differentially implicate H2AK15ac at DSB (figure 3.7A-B and 3.S7B-C). Interestingly, an increase of H2AK15ac is detected at DNA breaks specifically in S/G2 and only at sites preferentially repaired by HR. However, in G1 cells, these same DSB sites showed a decrease of H2AK15ac, arguing that TIP60 function at DSB is predominant in S/G2. In parallel, DSB sites that are preferentially repaired by NHEJ (and preferentially located in non-transcriptionally active regions) showed stable very low levels of H2AK15ac in both G1 and S/G2.

3.4 Discussion

Activities of the multifunctional TIP60/NuA4 complex are modulated by a number of internal motifs capable of reading histone marks. Subunits of the complex contain domains that individually are capable of binding histone PTM in distinct genomic contexts (figure 3.7C). Thus, it is crucial to consider the TIP60 complex as a whole in order to fully understand any of its functions. Furthermore, conducting experiments in conditions close to physiological is essential as true histone target specificity is often only achieved with native modifying or remodeling complexes and their *bona fide* chromatin substrates (Lalonde et al., 2014).

In this study, we identified MBTD1 as a new stable stoichiometric subunit of the TIP60 complex, with which it appears to be exclusively associated. This protein can read histone PTM through its quadruple MBT repeat and displays a strong affinity for H4K20me1/2 (K_D 7-13 mM)(Eryilmaz et al., 2009). Our discovery of the physical association between MBTD1 and TIP60 can reconcile contradictory observations about the role of H4K20me1 and the enzyme responsible for its deposition, SETD8. Prior studies had predominantly linked them to gene repression. This conclusion had been reached mainly through work on the L3MBTL1/2 transcription repressors that also contain H4K20me1/2-specific MBT repeats (van Nuland and Gozani, 2015). Inexplicably, ChIP-seq analysis of H4K20me1 had demonstrated a relatively high occupancy of this histone mark within bodies of actively transcribed genes (Ernst et al., 2011). Furthermore, mass spectrometry analysis had uncovered a frequent co-occurrence of transcriptionally permissive acetylated lysines and K20me1/2 within the tails of the same histone molecules (Pesavento et al., 2008b). Our present discovery of the MBTD1-TIP60 association finally establishes a clear link between H4K20me1/2 and transcription activation. It will be interesting to investigate whether this connection is responsible for the role of H4K20me1 in local regulation of RNA polymerase II pausing through targeted H4 acetylation (Kapoor-Vazirani and Vertino, 2014).

Both the TIP60 complex and H4K20me are important players in the cellular response to DNA double strand breaks. H4K20 methylation at DSB is rapidly recognized by the double Tudor domain of 53BP1 (Botuyan et al., 2006). Other H4K20me readers, L3MBTL1 and JMJD2A/KDM4A, are actively displaced to allow 53BP1 to bind damaged chromatin (Panier and Boulton, 2014). Acetylation of the H4 tail by Tip60/KAT5 has been hypothesized to disrupt the interaction of 53BP1's tandem Tudor domain with the neighboring H4K20me2 (Panier and Boulton, 2014; Tang et al., 2013). Interestingly, budding yeast KAT5/Esa1 performs an opposite function to that of the 53BP1 homolog Rad9 in controlling the cell cycle upon DNA damage (Javaheri et al., 2006). However, budding yeast lacks H4K20 methylation, which may explain the absence of an MBTD1 homolog in the yeast NuA4 complex.

Given the above, it was intriguing to investigate a possible role of MBTD1 in the cellular response to DNA damage. Our results presented demonstrate that MBTD1 can displace 53BP1 for the H4K20me2 mark *in vitro* and affect the formation and stability of 53BP1 foci after DNA damage *in vivo*. MBTD1 and TIP60 regulate the disappearance of these foci at a later time-point after damage – a process that mirrors TIP60's role in removing γ -H2AX foci within a similar time frame. These activities are clearly important for repair of DSB by homologous recombination, as TIP60 is required for efficient loading of Rad51 (Courilleau et al., 2012; Murr et al., 2006). Thus, our observations favor the model in which the TIP60 complex promotes HR repair over NHEJ by decreasing 53BP1 occupancy on damaged chromatin,

thereby relieving inhibition of DNA end resection and homology search (Panier and Boulton, 2014; Tang et al., 2013).

We show that the EPC1 subunit of TIP60 is responsible for the direct association of MBTD1 with the complex. In addition, EPC1 interacts with the N-terminal tail of histone H2A in the nucleosome, which is critical for H4 acetylation by TIP60 (Huang and Tan, 2013; Lalonde et al., 2013). This led us to investigate whether TIP60 and 53BP1 also vie for chromatin interaction via the H2A tail. DNA damage-induced ubiquitylation of H2A on K13 and K15 by RNF168 is critical for 53BP1 binding through its UDR domain, as well as for signaling (Fradet-Turcotte et al., 2013). In this study, we show that while H2AK15ub nucleosomes are refractory to modification by TIP60, acetylation of H2AK15 is induced *in vivo* in response to DNA damage. This ubiquitylation/acetylation switch is clearly a powerful mechanism of regulating 53BP1 binding and TIP60-dependent histone H4 acetylation. Taken together, our observations of the events surrounding H4K20me demonstrate distinctly incompatible binding and opposing functions of 53BP1 and TIP60/NuA4 on nucleosomes near DNA lesions (figure 3.7D).

53BP1 is a bivalent chromatin reader, binding both H2AK15ub and H4K20me2 via its Tudor and UDR regions. Strikingly, TIP60 targets the same two nucleosome surfaces through MBTD1 and EPC1. If TIP60 gains the upper hand in binding nucleosomes near DNA breaks, local acetylation of the H4 tail further blocks 53BP1 binding, as proposed previously (Tang et al., 2013). Naturally, activities of deacetylases and de-ubiquitinases of H2AK15 are critical in shifting the balance between 53BP1 and TIP60. This is consistent with the established model in which HDAC1/2 promote end joining of DSB, likely by negating the activity of TIP60 (Miller et al., 2010). Importantly, acetylation of H2AK15 after DNA damage is induced throughout the nucleus and not only in the vicinity of DSBs. We hypothesize that this may serve to block promiscuous ubiquitylation of H2A by RNF168, which is induced as part of the repair process, restricting it to the vicinity of DNA lesions (Gudjonsson et al., 2012). Likewise, increased levels of H2AK15ac in the G2/M phase of the cell cycle may be linked to homologous recombination, but may also block unwanted DSB repair during mitosis (Orthwein et al., 2014).

Overall, the identification of MBTD1 as a stable subunit of the TIP60 complex raises several interesting questions. The putative oncogenicity of several translocations or truncations of EPC1, found in uterine sarcoma and leukemia, could be partly explained by the loss of MBTD1 from the complex (Avvakumov and Cote, 2007). It will also be very interesting to investigate the function of MBTD1 in gene regulation and chromatin dynamics *vis-a-vis* other H4K20me readers like the L3MBTL1/2 repressors. Furthermore, both 53BP1 and L3MBTL1 can bind specific mono- and di-methylated lysines on tumor suppressors p53, thereby regulating its function (Kachirskaia et al., 2008; West et al., 2010). Thus, it will be important to examine whether MBTD1 can also target such non-histone proteins and counteract their

inhibition. Finally, 53BP1 itself is acetylated *in vivo* on multiple lysine residues, including those near the UDR domain and within the dimerization domain (phosphosite.org). Therefore, it will be intriguing to determine whether these modifications are carried out by TIP60 to further regulate 53BP1 function in the cellular response to DNA damage.

In conclusion, our findings reveal new insights about TIP60 composition, architecture and function during transcription and DNA repair. Notably, our data further uncover the role in repair pathway choice played by TIP60 through multivalent interactions and chromatin modifications at DNA breaks. This study highlights the intricate crosstalk between acetylation, methylation and ubiquitylation of chromatin in proper coordination of DSB repair. Retention of 53BP1 on damaged chromatin appears to be the key element in the decision between HR and NHEJ. Therefore, the incompatibility between TIP60 and 53BP1 is instrumental in the temporal and spatial orchestration of DSB repair, which relies on complex and finely modulated interactions between a variety of chromatin post-translational modifications.

3.5 Acknowledgments

We are grateful to members of the Côté and Durocher labs as well as Roger Greenberg for helpful discussions. We are also in debt to Yvan Canitrot and Didier Trouche for advice, discussion and sharing preliminary data. We thank Matthew Porteus for NHEJ/HR reporter plasmids, Valerie Côté for FACS analysis, Lianne Dale (Leica Microsystems) for technical support and Laval University/Compute Canada for the use of supercomputers. This work was supported by grants from: the Canadian Institutes of Health Research (CIHR) to A.-C.G. (MOP-123322), D.D. (FDN-143343) and J.C. (MOP-64289, FDN-143314); the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) to Y.D. (RGPIN-2014-059680); the European Research Council (ERC-2014-CoG 647344), Agence Nationale pour la Recherche (ANR-14-CE10-0002-01 and ANR-13-BSV8-0013), and the Ligue Nationale contre le Cancer (LNCC) to G.L.; the National Institutes of Health (NIH) to T.K.P. (CA129537, CA154320, and GM109768); and the Quebec Breast Cancer Foundation to J.C.

K.J was supported by PhD studentships from Laval University Faculty of Medicine and Fonds Québécois de la Recherche sur la Nature et les Technologies. A.F.-T. and J.-P.L were supported by post-doctoral fellowships from the CIHR and J.-P.L. also by a TD Bank Health Research Fellowship at the Lunenfeld-Tanenbaum Research Institute. A.-C.G. holds the Canada Research Chair in Functional Proteomics and the Lea Reichmann Chair in Cancer Proteomics. Y.D. is junior 1 scholar from the Fonds de la Recherche du Québec-Santé (FRQS). D.D. holds the Canada Research Chair in the Molecular Mechanisms of Genome Integrity and J.C. the Canada Research Chair in Chromatin Biology and Molecular Epigenetics.

3.6 Supplemental experimental procedures

3.6.1 Establishment of isogenic cell lines expressing TIP60 components from the AAVS1 safe harbor

K562 cells stably expressing 3xFLAG-HA-tagged Tip60 (PLIP or Tip60 β isoform), EPC1 or MBTD1 were established as following. Briefly, the AAVS1-targeting plasmid was assembled into the AAVS1 hPGK-PuroR-pA donor (Hockemeyer et al., 2009b) (Addgene #22072) by inserting a synthetic DNA fragment containing a 3xFLAG-1xHA TAP tag sequence in frame with a 2A-puro sequence in between the hPGK1 promoter and the BGH poly-adenylation site. The cassette is integrated at the AAVS1 locus after DSB induction and recombination targeted by co-transfection with ZFN expression plasmid. The AAVS1-targeting ZFNs have been previously described (Hockemeyer et al., 2009b). The expression vector was modified in order to remove the FLAG epitopes. One million cells were transfected with 1 μ g of ZFN expression vector and 4 μ g of donor constructs. Selection and cloning were performed in RPMI medium supplemented with 0.5 to 2 μ g/ml puromycin starting at 2 to 3 days post transfection. Clones were obtained by limiting dilution and expanded before harvest for western blot analysis.

3.6.2 Purification of native HAT complexes

Native TIP60 complexes were purified from 1L of K562 cells. Nuclear extracts were prepared following standard procedures (Abmayr et al., 2006) and pre-cleared with CL6B sepharose beads. FLAG immunoprecipitations with anti-FLAG agarose affinity gel (Sigma M2) were performed followed by elution with 3xFLAG peptide (200 μ g/ml from Sigma in the following buffer: 20mM HEPES pH7.5, 150mM KCl, 0.1mM EDTA, 10% glycerol, 0,1% Tween20, 1mM DTT and supplemented with proteases, deacetylases and phosphatases inhibitors).

3.6.3 Mass spectrometry analysis

Affinity purified materials were resolved on a short SDS-PAGE gel, in-gel digested with trypsin and subsequently analyzed by LC-MS/MS using an Agilent 1100 HPLC system (Agilent Technologies) coupled to a LTQ mass spectrometer (Thermo-Electron) as per (Couzens et al., 2013). The MBTD1 sample showing a weaker silver staining pattern was analyzed using a NanoLC-Ultra 1D plus (Eksigent, Dublin CA) nano-pump coupled to a TripleTOF™ 5600 instrument (AB SCIEX, Concord, Ontario, Canada) as per (Lambert et al., 2014). The resulting data generated by the mass spectrometers were stored, searched and analyzed using the ProHits laboratory information management system (LIMS) platform

(Liu et al., 2010). Within ProHits, the resulting .RAW files were converted to a MGF format using ProteoWizard (v3.0.4468) and then searched using Mascot (v2.3.02) with the RefSeq database (version 45, February 19th, 2010) acquired from NCBI against a total of 34604 human sequences. The database parameters were set to search for tryptic cleavages, allowing up to 1 missed cleavage sites per peptide with a mass tolerance of 3 Da for precursors with charges of 1+ to 3+ and a tolerance of +/- 0.6 Da for fragment ions. For the resulting WIFF files, they were first converted to a MGF format using WIFF2MGF converter and to an mzML format using ProteoWizard (v3.0.4468) and the AB SCIEX MS Data Converter (V1.3 beta) and then searched using Mascot (v2.3.02). The spectra generated by the tripleTOF were searched with the RefSeq database (version 53, May 28th, 2014) acquired from NCBI against a total of 34374 human and adenovirus sequences supplemented with "common contaminants" from the Max Planck Institute (<http://maxquant.org/downloads.htm>) and the Global Proteome Machine (GPM; <http://www.thegpm.org/crap/index.html>). The database parameters to search WIFF files were set to search for tryptic cleavages, allowing up to 2 missed cleavage sites per peptide with a mass tolerance of 40 ppm for precursors with charges of 2+ to 4+ and a tolerance of +/- 0.15 amu for fragment ions. Carbamidomethyl of cysteine was selected as a fixed modification while oxidized methionine, deamidated asparagine and glutamine were selected as a variable modification. All MS files generated as part of this study were deposited at MassIVE (<http://massive.ucsd.edu>). The MassIVE ID is MSV000079147 and the MassIVE link for download is <http://massive.ucsd.edu/ProteoSAFe/status.jsp?task=0230b0e090e14374acc404aec2f4844d>.

The password for download prior to final acceptance is MBTD1.

3.6.4 CRISPR/Cas9-mediated KO of MBTD1 in U2OS cells and microarray analysis

U2OS CRISPR KO cell lines were established essentially as described in (Dalvai et al., 2015) by inserting in both alleles a DNA fragment with 3 stop codons, a BamH1 site and a frameshift 22 nucleotides downstream of the ATG (figure 3.S5A). CMV-driven human-codon optimized Cas9 nuclease vector was obtained from Addgene (#41815). gRNA expression vector was built in the MLM3636 backbone (Addgene #43860). Target sequence for MBTD1 (5'- CGGTTATGATAGCTGCAGTG-3') was chosen according to a web-based CRISPR design tool (Hsu et al., 2014). For targeting with the CRISPR/Cas9 system, 10⁶ cells were transfected with 2 mg of gRNA, 4 mg of Cas9, and 4 mg of donor plasmids by Amaxa 4D-nucleofector (Lonza). Three days post-transfection, cells were diluted for colony isolation and amplification followed by PCR screening. KO clones were validated by PCR screening and sequencing of the alleles.

RNA samples from 3 different validated KO clones were compared to 3 WT control (cells transfected with empty pMLM3636). Illumina HumanHT-12 version 4 microarrays were used to acquire gene expression quantifications for the selected clones. The genome-wide gene expression data were pre-processed using R and the Bioconductor lumi (Du et al., 2008). Briefly, the data were first log₂ transformed and then quantile normalized. We looked at several quality control plots like PCA and hierarchical clustering on the most variable genes (standard deviation/mean expression > 0.1) and, as expected, the WT and KO sample co-cluster together supporting the overall good reproducibility of our data. Microarray data have been deposited in the GEO database under accession number GSE78027. We assessed statistical differential expression using the Bioconductor package limma (Smyth, 2004). Gene enrichment analyses were performed using the Enrichr tool (Chen et al., 2013a).

3.6.5 Antibodies and RNA interference

The following antibodies were used for Western blotting at the indicated dilution: anti-FLAG -HRP conjugate (Sigma M2, 1:5000); anti-MBTD1 (Abcam ab116361, 1:1000); anti-Brd8 (Bethyl A300-219A, 1:10000); anti-DMAP1 (Thermoscientific PA1-886, 1:1000); anti-P400 (Abcam ab5201, 1:1000); anti-TRRAP (Santa Cruz sc5405, 1:1000); anti-MRG15 (Active Motif 39361, 1:1000); anti-MRGBP (Abnova H00055257-B01, 1:2000); anti-MRGX (Abnova PAB6152, 1:1000); anti-Tip60 (Epitomics S2475, 1:1000); anti-ING3 (Abcam 3713, 1:1000); anti-His (Babco MMS-156R-500, 1:1000); anti-GST (Sigma G1160, 1:4000); anti-MBP (NEB E8032, 1:10000); anti-HA (Babco 16B12, 1:1000); anti-actin β (Bioshop TLC002.100, 1:10000); anti-H2AK15-Acetyl (Abcam ab101447, 1:1000); anti-H2A (Upstate 07-146, 1:1000); anti- γ -H2AX (Upstate 07-164, 1:1000); anti-H2AK5-Acetyl (Abcam ab1764-100, 1:1000); anti-H4penta-Acetyl (Upstate 06-946, 1:3000); anti-H4K16-Acetyl (Active Motif 39167, 1:1000); anti-H4K12-Acetyl (Upstate 06-761, 1:1000); anti-H4K8-Acetyl (Abcam ab15823, 1:1000); anti-H4K5-Acetyl (Serotech AHP962, 1:1000); anti-H3-Acetyl (Upstate 06-599, 1:500); anti-H3-phospho-S10 (Upstate, 1:1000); anti-H2B (Abcam 1790, 1:5000); anti-H3 (Abcam 1791, 1:10 000); anti-53BP1-S1778-phospho (Cell Signaling 2675, 1:1000); anti-RPA2-T21-phospho (Abcam 211551; 1:1000); anti-RPA2-S4/S8-phospho (Novus NBP1-23017; 1:1000); anti-H4 (Abcam 7311, 1:5000). The following siRNA were used against the indicated proteins: KAT5 smartpool (Dharmacon, CCACAGAUCACCAUCAUUG, GAACAAGAGUUAUUCAG, CACAGGAACUCACCACAUU, GGACAGCUCUGAUGGAAUA), MBTD1#1 (Sigma, CUAGAACUAUUCAGCAUAA), MBTD1#2 (CAGGUAAGACAUUAAGACU), control luciferase (AACUGACGCGAAUACUUCGA), PALB2 (Dharmacon, GGAAAGAGCCGGUUGUAAA), RNF168 smartpool (Dharmacon, GGAAGUGGCUGAUGACUUAU, GAAAUUCUCUCGUCAACGU,

AGAAGGAGGUGGAUAAAGA, GAGUAUCACUUACGCGCUA). The following shRNA were used against the indicated proteins: EP400 shRNA from OpenBiosystem (TRC0000050262), ING3 shRNA (generated with the specific sequence 5'TGGTTCCATTATGGCTGCG 3' in expression vector pSUPER). Knockdown efficiency was validated by RT-qPCR with the following primers: Tip60-A (TGACTTCAACAAACGTCTGG; GTCACACTTGGTCAAATGACG), MBTD1-A (GAAGTAGACCAGAGTGGGGAA; GAGGCTGTAGTTGATATCCAG), GAPDH-A (TCATCATCTCTGCCCCCTCTG; CGCCTGCTTACCACCTTCTT).

3.6.6 ChIP-seq experiments and analysis

For FLAG ChIP, 1mg of cross-linked chromatin from K562 cells was incubated with 10 μ g of anti-FLAG antibody (Sigma, M2) pre-bound on 300 μ l of Dynabeads Prot-G (Invitrogen) overnight at 4C. The beads were washed extensively and eluted in 0.1% SDS, 0.1M NaHCO₃. Crosslink was reversed with 0.2M NaCl and incubation overnight at 65C. Samples were treated with RNase and Proteinase K for 2h and recovered by phenol chloroform and ethanol precipitation. Quantitative real-time PCRs were performed on a LightCycler 480 (Roche) with SYBR Green I (Roche) to confirm the specific enrichment at defined loci compared to intergenic regions. Libraries for sequencing were prepared as described (Avvakumov et al., 2012). Samples were sequenced by 50 bp single reads on HiSeq 2000 platform (Illumina). Raw sequences were mapped using Bowtie version 0.12.8 on build hg19 of the human genome and deposited in the GEO database under accession number GSE78027 (Langmead et al., 2009). Read alignments in sam format were converted to bam files using samtools (Li et al., 2009a). Samtools was then successively applied to remove duplicated reads, sort, and index bam files. Peak calling was performed using MACS version 1.4.0 by comparing the Tip60, EPC1, EPC1(1-581) and MBTD1 flag signals to the signal obtained from the mock experiment (Zhang et al., 2008). We identified intersection between two sets of significant peaks in hg19 coordinates using the bedtools "intersect" function (Quinlan and Hall, 2010). We used IGV for ChIP-seq signal visualization in genomic context (Thorvaldsdottir et al., 2013). Enrichment analyses on genes flanking the 368 commonly bound regions were done using Enrichr (Chen et al., 2013a).

3.6.7 ChIP at DSB

For FLAG ChIP at DSB with the AsiSI system, U2OS stable cell lines were first established by introducing the hPGK-PuroR-pA-3xFLAG-1xHA-MBTD1 or empty cassette at AAVS1 locus as described before. Then

cells were further transfected with the pAID-AsiSI-ER plasmid (Aymard et al., 2014) using calcium phosphate co-precipitation method and selection was performed with 800 µg/mL G418. Monoclonal, stable cell lines were selected based on 4OHT response and/or MBTD1-Flag expression. AID-DivA MBTD1-Flag and AID-DivA Flag-only cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with antibiotics, 10% FCS (Invitrogen), 0.5 µg/mL puromycin and 800 µg/mL G418 at 37°C under a humidified atmosphere with 5% CO₂. For AsiSI-dependent DSB induction, cells were treated with 300 nM 4OHT (Sigma; H7904) for 4h. ChIP was performed according the protocol described in (Iacovoni et al., 2010), with the following modifications: 200 µg of chromatin was immunoprecipitated by using 2µg of a mixture of anti-Flag antibodies (monoclonal M2 Sigma: polyclonal rabbit anti-FLAG SIGMA F7425, 1:1) or without antibody (mock). Immunoprecipitated DNA and input DNA were analyzed in duplicate by RealTime-quantitative PCR.

For ChIP of chromatin marks at the break, AID-DivA Flag-only cells were cultured and induced as described above. ChIP was performed according to the protocol described in (Avvakumov et al., 2012). Briefly 200 µg of chromatin was immunoprecipitated with 1-3ug of anti-H2AK15ac (Abcam ab101447), anti-g-H2AX (Abcam ab81299), anti-H3 (Abcam ab1791) overnight at 4C and incubated with 50ul of Dynabeads Protein A 4h at 4C. The beads were washed extensively and eluted in 0.1% SDS, 0.1M NaHCO₃. Crosslink was reversed with 0.2M NaCl and incubation overnight at 65C. Samples were treated with RNase and Proteinase K for 2h and recovered by phenol chloroform and ethanol precipitation. Quantitative real-time PCR primers used are the following: control locus (TGGCTGGAAGCTGCTTTCTTT; GGTGAGTGAATGAGCTGCAA); DSB_V (GTCAGTATGGCCCCAGAGTC; ACGGCTGATGGACTTAGACG); DSB_3 (ATCGGGCCAATCTCAGAGG; GCGACGCTAACGTAAAGCA); DSB_I (TATGGGACCAAGCGAGTAGG; GCCTCACACACACCCATA); DSB_1 (GGAGAAGTGGCAGGACAATG; CAAGGCAAATTTGGGGACTA).

3.6.8 *In vitro* histone acetylation assay

0.5µg of the indicated substrates in a 15µl reaction containing 50mM Tris-HCl pH8.0, 10% glycerol, 1mM EDTA, 1mM DTT, 1mM PMSF, 10mM sodium butyrate and 0.25 µCi/µl (4.9 Ci/mmol) of [3H]-labeled Acetyl-CoA (Perkin Elmer) or 0.15mM unlabeled Acetyl-CoA (Sigma). Samples were either spotted on P81 membrane (GE Healthcare) for count or analyzed on 18% SDS-PAGE. For radioactive gel assays, Coomassie staining was followed by treatment with Enhance® (Perkin Elmer) and fluorography, or by western blot analysis for non-radioactive assays. Human chromatin and free histones were purified from

HeLa S3 cells as previously described (Uttley et al., 1996). Standard and time course HAT experiments were performed on NCP reconstituted with recombinant histones purified in bacteria as previously described (Dyer et al., 2004).

3.6.9 Recombinant MBTD1, 53BP1 and EPC1 purifications and pull-downs

The MBTD1 MBT (aa141 to 560), N-terminal (aa40 to 80) or full length protein, 53BP1 Tudor (aa1484 to 1603) and EPC1 C-terminal (aa582 to 836) domains were expressed in *E. coli* BL21 cells grown in LB media with pGEX3T4, pET32b or pMBP. After induction with IPTG (30 μ M) overnight at 16C, bacteria were harvested and GST or 6xHis-tagged proteins were purified as previously described with minor modifications (Lalonde et al., 2013). MBP tagged protein purification was performed with Amylose resin from NEB following the manufacturer indications. Recombinant proteins eluted with maltose were dialyzed in a buffer containing 20 mM Tris-HCl pH7.0, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 20% glycerol.

Protein and peptide pull-down experiments were performed as previously described with minor modifications (Saksouk et al., 2009). Protein pulldowns were performed in 25mM Hepes-NaOH pH7.5, 150 mM NaCl, 10% glycerol, 10 μ M ZnCl₂, 0.1% Tween 20, 100 μ g/ml BSA 1h at 4C. Peptide pull-downs with GST and MBP fusion proteins were performed using biotinylated peptides (Anaspec) and M280 Streptavidin magnetic beads (Life) in Tris-HCl pH7.0, 450 mM KCl, 0.1% BSA, 0.05% NP40 incubated 30 min at 30C. For competition experiments, purified MBP tagged Tudor domains of 53BP1 were bound to H4K20me₂ peptide as performed previously (Tang et al., 2013). Briefly 50pmol of biotinylated H4K20me₂ peptide (aa1 to 23) was incubated with a 2-fold molarity excess of WT 53BP1 Tudor or mutant D1521R overnight at 4C under rotation (final volume 100 μ l in binding buffer 100 μ l, 50 mM Tris-HCl pH7.5, 150 mM NaCl, 0.05% NP40, 100 μ g/ml BSA). Then 25 μ l of streptavidin beads were added to the reaction for 1h under rotation and followed by quick washes with the same buffer. GST-tagged MBT-repeat domain was then added to the reaction at different concentrations (complemented with BSA in a final volume 100 μ l) under rotation for 1h at 4C. The beads were submitted to intensive washes without BSA and analyzed by western blot.

3.6.10 Immunofluorescence

Time course for g-H2AX foci resolution were performed on 293 cells as previously described (Sharma et al., 2010) with shRNAs EP400 and ING3 vs CTL or siRNAs MBTD1#1 and 2 vs siRNA luciferase control. Endogenous 53BP1 foci dynamic was studied in U2OS cells 48h after transfection with MBTD1 siRNA#1

and 2 and control. For each condition, 40 nM of the indicated siRNA were transfected into U2OS using DharmaFECT (ThermoFisher) in a forward transfection mode, following the manufacturer's protocol. Cells were fixed and processed for anti-53BP1 (Bethyl A300-273A) and anti- γ H2AX (Millipore JBW301) immunofluorescence at 0, 1 and 5 hours post-irradiation (2Gy), as described previously (Panier et al., 2012). For H2AK15ac immunofluorescence, U2OS were transfected with siRNA (siCTL, siTip60 or siRNF168) for 48h followed by treatment by 5Gy irradiation and submitted to detergent extraction with 0.25% Triton 5min, fixation with 2% paraformaldehyde 10 min and immunofluorescence anti-H2AK15 acetyl (Abcam, ab101447 1:100), anti-gH2AX (Upstate 05-636, 1:8000) and DAPI staining. For each condition, 90 to 150 cells were analyzed for DAPI and H2AK15ac intensity signal on TSC SP8 confocal (Leica) using Leica Application Suite X Core software.

3.6.11 HR / NHEJ assays and cell cycle analysis

U2OS cell lines were established with plasmids containing already characterized I-Sce1 reporter cassettes DR-GFP and GFP-RFP to measure HR and NHEJ, respectively (Pierce et al., 1999; Potts et al., 2006; Sharma et al., 2010). Experiments were performed with different stable reporter clones. Data represent duplicate experiments with a representative clone. The cells were transfected with 30nmol of the indicated siRNA using Lipofectamine RNAimax (Invitrogen) for 36h and infected with I-Sce1 adenovirus for 1h. Cells are harvested 48h after DSB induction and analyzed by FACS (Plateforme de cytométrie du CHUL) for GFP and/or RFP expression on a BD SORP LSR II. Control in different stable clones produce between 5 and 10% of GFP positive cells after DSB induction in the HR reporter, or RFP positive/GFP negative cells in the NHEJ reporter. For complementation experiment with WT or triple mutant MBTD1, siRNA#1-resistant forms were produced by PCR mutagenesis and 1mg of expression vector was co-transfected with pCAG-I-Sce1 (1mg) and pmCherry (0.1mg) plasmids using Lipofectamine 2000. Cells expressing mCherry were further analyzed by FACS for GFP.

For cell cycle studies, WT U2OS cells were synchronized by double thymidine block (2mM thymidine for 24h with 8h release, 24h re-block and final release), thymidine and nocodazole (2mM thymidine for 24h with 3h release, 40ng/ml nocodazole 14h with or without 30 min release) or left untreated for asynchronous population. The cells were harvested by trypsinization, half was fixed with 70% ethanol, treated with propidium iodide for FACS analysis on a BD-Fortessa or submitted to histone acid extraction followed by western blot analysis.

3.6.12 Chromatin extract and histone acid extraction

Enriched chromatin extracts were prepared as followed. Briefly 293T were seeded in 100 mm dishes and transfected with 25 µg of plasmids (pcDNA3-HA-ING3, pcDNA3-HA-EAF6, pcDNA3-FLAG-Tip60 WT or mutant E403Q, pRCF-MBTD1, pRCF-EPC1) with calcium phosphate and incubated for 48h. Cells were harvested, washed once with PBS 1X and resuspended in buffer 1 (50mM Tris-HCl pH7.5, 100mM NaCl, 1mM EDTA, 1mM DTT, protease inhibitor cocktail, 1mM PMSF, NEM). Cell suspension was incubated 5 min on ice, homogenized then centrifuged at 1000g for 15 minutes. Supernatant was discarded. Nuclei were then resuspended in buffer 2 (50mM Tris-HCl pH7.5, 300mM NaCl, 1mM EDTA, 5mM CaCl₂, 1mM DTT, protease inhibitor cocktail, 1mM PMSF), incubated 10 min on ice and sonicated 3 times (30s). Chromatin enriched extracts were finally clarified by centrifugation at 1000g for 20 min. Histone acid extraction was performed as previously described (Doyon et al., 2006).

3.6.13 In vitro histone acetylation and ubiquitylation assays

Histone acetyltransferase assays were performed as described previously with minor modifications (Boudreault et al., 2003) using the different complexes (detailed information is in the supplemental experimental procedures). For ubiquitylation assays, mono-nucleosomes (Gupta et al., 2014) purified from HeLa cells were ubiquitylated by incubating 3 µg of MN with 30nM of recombinant Uba1, 1,5 µM UbcH5a, 4 µM RNF168-RING domain (1-113) and 22 µM ubiquitin in reaction buffer containing 50mM Tris HCl pH7.5, 100 mM NaCl, 10mM MgCl₂, 1µM ZnOAc, 1mM DTT and 3,33 mM ATP for 4h at 30C. Control reactions were made in parallel (without ATP or E3). The MN were then treated with "100kDa centricon" to remove the exceeding ATP, RNF168, UbcH5a and ubiquitin potentially inhibiting the acetyltransferase activity and for buffer exchange (50 mM Tris pH8.0, 50 mM NaCl).

3.6.14 COMET assay

For alkaline COMET assay, cells were treated with etoposide (50µM, 15min) and processed according to the manufacturer's recommendations (Trevigen). The tail moment was quantified with ImageJ (OpenComet plugin). In parallel, an aliquot of cells was used for whole cell extraction and western blot analysis as described in (Carvalho et al., 2014).

3.6.15 Colony formation assays

Colony assays were performed as previously described (Doyon and Cote, 2004). Briefly cells U2OS cells were transfected with 15 μg of pREV-CMV-3xFLAG vector alone or carrying MBTD1 cDNA with Lipofectamine 2000. At 48 h posttransfection, the cells were diluted serially into media supplemented with hygromycin 600 $\mu\text{g}/\text{ml}$. After 2 weeks of selection, resistant colonies were fixed and stained with Giemsa. Analysis of MBTD1 expression by Western blot was performed on whole cell extracts prepared from an aliquot of the 48h-transfected cells as previously described (Avvakumov et al., 2012). Quantification is based on duplicate experiments and presented with standard deviations.

3.7 Supplemental figures and tables

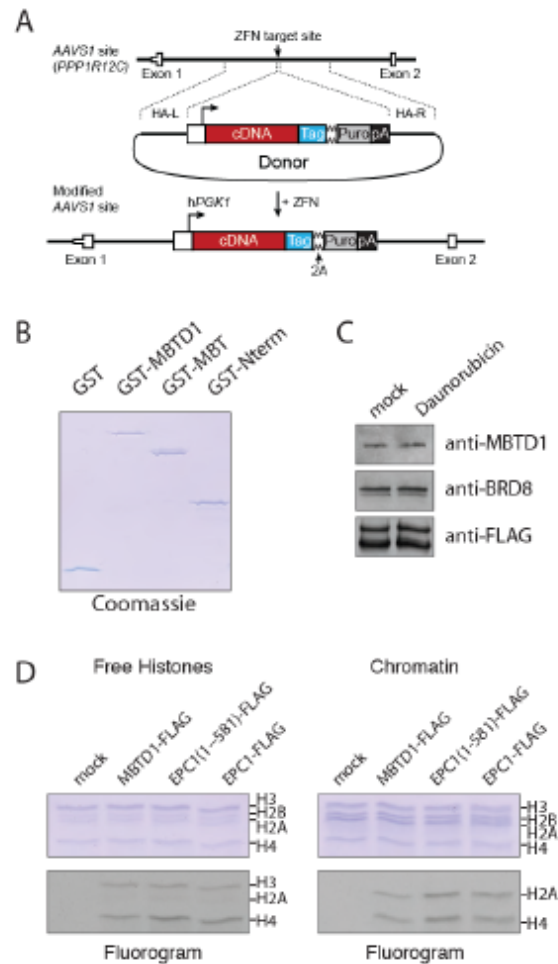


Figure 3.S1: Identification and role of MBTD1 within the TIP60 complex

(A) Genomic editing with the AAVS1 targeting system allows purification of TIP60 native complex and identification of MBTD1. Schematic of the donor construct and the AAVS1 locus following ORF insertion. The first two exons of the *PPP1R12C* gene are shown as open boxes. Also annotated are the locations of the human phospho-glycerate kinase 1 promoter (hPGK1), 3xFLAG-1xHA tandem affinity tag (Hateboer et al.), 2A self-cleaving peptide sequence (2A), puromycin resistance gene (Puro), poly-adenylation sequence (pA) homology arms left and right (HA-L, HA-R). (B) *In vitro* acetylation assays with purified native complexes from figure 3.1. TIP60 complexes purified through EPC1 (WT or (1-581)) or MBTD1 show a similar global HAT activity towards H3, H4 and H2A on free histones (left panel) or towards H4 and H2A on chromatin (right panel). (C) Coomassie stained gel of GST GST-fusion proteins used in pull-down assays (MBTD1 full length; MBTD1 N-terminus: aa1 to 140; MBT domains of MBTD1: aa141 to 560). (D) MBTD1 binds EPC1 C-terminus domain independently of DNA damage. MBTD1 is present within TIP60 complex in presence of DNA damage induction. K562 cell line EPC1-3xFLAG was treated by daunorubicin (0.25 μ M, 24h) or mock treated with DMSO and harvested for native TIP60 complex purification (related to Figure 3.1).

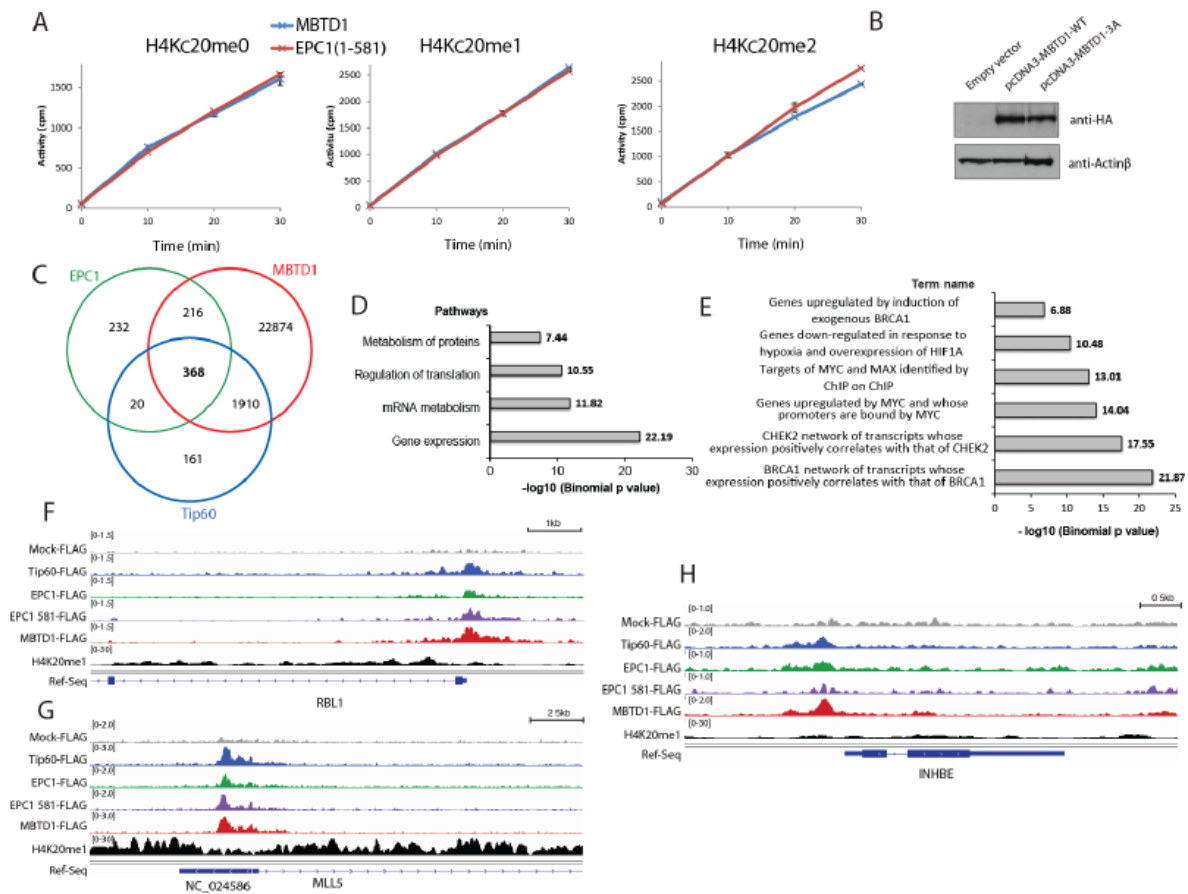


Figure 3.S2: Influence of MBTD1 in TIP60 interactions with chromatin *in vitro* and *in vivo*

(A) Influence of MBTD1 during the acetylation of H4K20me nucleosomes by the TIP60 complex. Time course analyses of nucleosome acetylation by purified native TIP60 complexes containing the MBTD1 subunit, or lacking it (MBTD1-3xFLAG and EPC1(1-581)-3xFLAG fractions from figure 3.1. Both complexes were first normalized on human chromatin purified from HeLa cells. *In vitro* reconstituted recombinant mononucleosomes were used and are lacking histone modifications, except for lysine 20 on histone H4 that contains a methyl-lysine analog (MLA represented as H4Kc20-methyl) **(B)** Overexpression of MBTD1 for clonogenic assays. A MBTD1 triple-mutant in the fourth MBT domain is also used and predicted to cripple H4K20me1 binding based on the crystal structure (Eryilmaz et al., 2009). U2OS cells were transfected in triplicates with WT HA-MBTD1 or F526-W529-Y533A mutant (3A mutant) or empty vector for 48h. **(C)** Overlap between MBTD1, Tip60/KAT5 and EPC1 localizations genome wide. Venn diagram showing the total regions of significant binding (peaks detected with the ChIP-seq FLAG data) of Tip60, EPC1 and MBTD1 and the shared regions where the proteins colocalized. The overlap between the 3 unique TIP60 subunits represents 368 genome locations defined as highly confident targets of the TIP60 complex in K562 cells. **(D)** **(E)** Prediction of TIP60 complex function in relation to the genomic regions commonly bound by Tip60, EPC1 and MBTD1. Genomic Regions Enrichment of Annotations Tool (GREAT) was used in order to identify associations of the highly confident TIP60 target genes (n=368) with cellular functions **(D)**(Pathways commons ontology) or genes sets signatures related to identified perturbation **(E)**(MSigDB Perturbation ontology). **(F)** **(G)** **(H)** Other

examples of gene promoters showing significant binding of Tip60, EPC1 and MBTD1 based on ChIP-seq analysis. ChIP-seq profiles (rpm; reads per million total reads) of MBTD1-3xFLAG by EPC1-3xFLAG, EPC1(1-581)-3xFLAG, Tip60/KAT5-3xFLAG and mock-3xFLAG in K562 cells obtained after anti-FLAG immunoprecipitation (cell lines in figures 3.1 and 3.2). RBL1/p107 tumor suppressor (F) and MLL5 H3K4 methyltransferase (G) genes are shown. Note that binding of the TIP60 complex is independent of MBTD1 since EPC1(1-581)-3xFLAG is also detected. This is in contrast to the INHBE gene (H) where the EPC1(1-581)-3xFLAG signal is lost compared to full-length EPC1, indicating that MBTD1 plays a specific role for TIP60 binding at this location. The H4K20me1 profile in K562 cells is from the ENCODE consortium dataset (number of reads) (Ernst et al., 2011)(related to Figure 3.2).

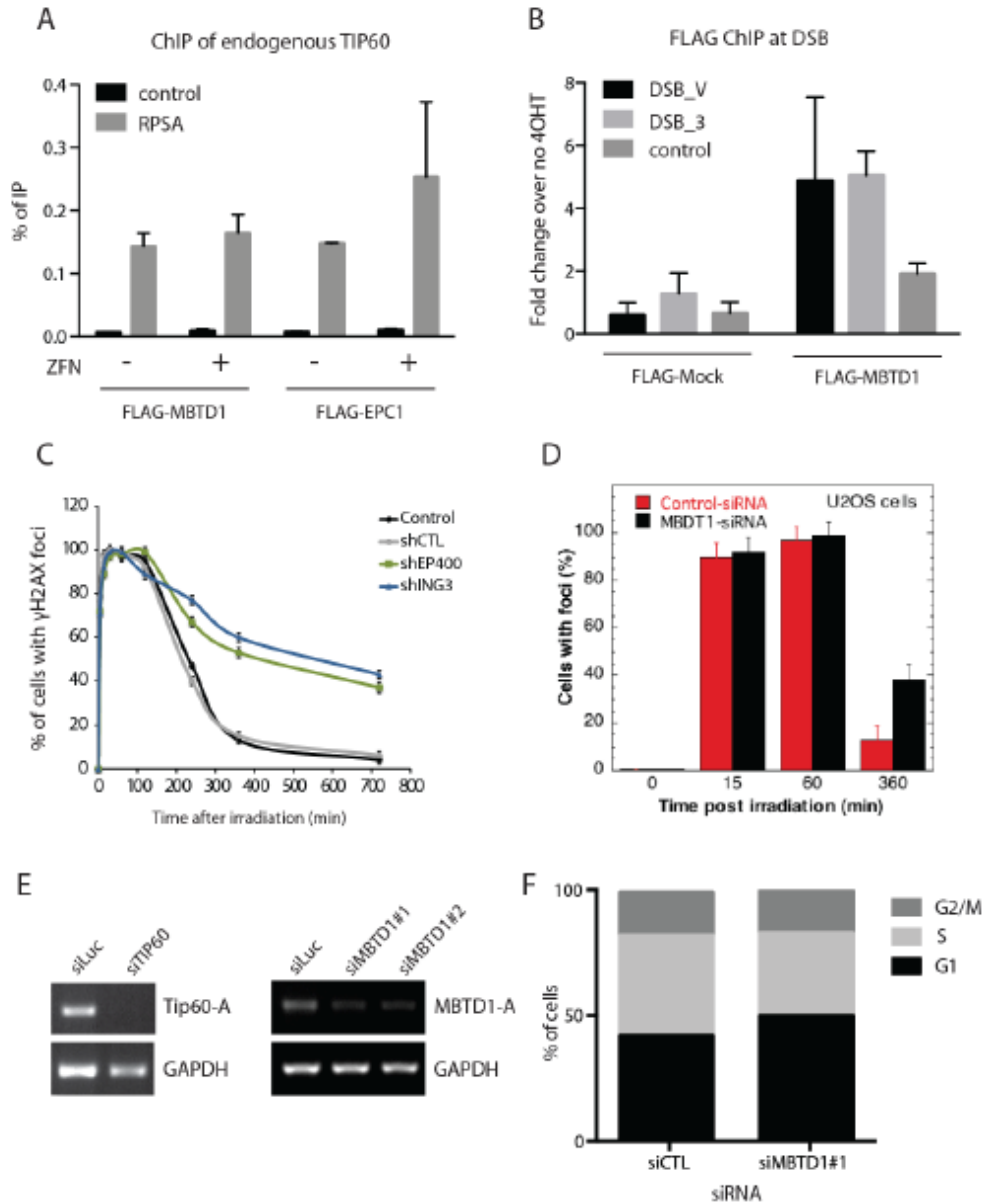


Figure 3.S3: MBTD1 is detected at DSB and affects the dynamics of γ -H2AX foci after DNA damage
(A) Anti-FLAG ChIP with CRISPR tagged cell lines MBTD1 and EPC1. qPCR analysis of signals obtained at control loci (negative/intergenic vs positive/RPSA) show the specific enrichment at TIP60 target gene

identified by ChIP-seq. **(B)** Anti-FLAG ChIP in the ER-AsiS1-AID DivA FLAG-empty and FLAG-MBTD1 cells after treatment with 4OHT. qPCR for two DSB loci are shown (DSB V favors HR while DSB 3 favors NHEJ) as well as a control. **(C)** TIP60 subunits EP400 and ING3 affect γ -H2AX foci dynamics after γ -radiations. 293 cells were transfected with the indicated shRNAs for 48h, treated with 2Gy γ -irradiations and processed for γ -H2AX immunofluorescence. Results are presented over time after irradiation as the percentage of cells with more than 4 γ -H2AX foci (mean \pm s.e.m, n=3). 100 cells were analyzed for each time-point. The persistence of γ -H2AX foci upon depletion of TIP60 subunits is clear even 12h after irradiation. **(D)** MBTD1 affects the dynamics of γ -H2AX foci after γ -radiations. Experiment similar to the one presented in figure 3.3B but using U2OS cells. The cells were transfected with a siRNA against MBTD1 vs siCTL for 48h, treated with 2 Gy γ -irradiations and processed for γ -H2AX immunofluorescence (mean \pm s.e.m, n=3). 100 cells were analyzed for each time-point. Persistence of cells with more than 4 γ -H2AX foci is detected 6h post-irradiation after MBTD1 depletion. **(E)** Validation of the different siRNAs used by RT-qPCR. Two different sets of primers were used as control. **(F)** Cell cycle profile analysis of U2OS cells 48 hrs after transfection with CTL or MBTD1#1 siRNAs. Values are based on three independent experiments and standard deviations are 5 and 3% for G1 (related to Figure 3.3).

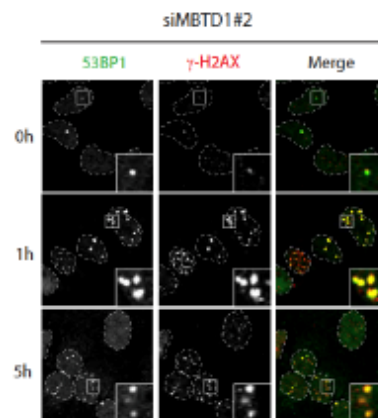


Figure 3.S4: MBTD1 affects the dynamics of 53BP1 foci after DNA damage

U2OS were transfected with another siRNA against MBTD1 (siMBTD1#2) and irradiated (2Gy) 48h post-transfection. Cells were processed for γ -H2AX and 53BP1 immunofluorescence 0, 1h and 5h after irradiation. Persistence of 53BP1 foci 5h after irradiation is again detected (related to Figure 3.4).

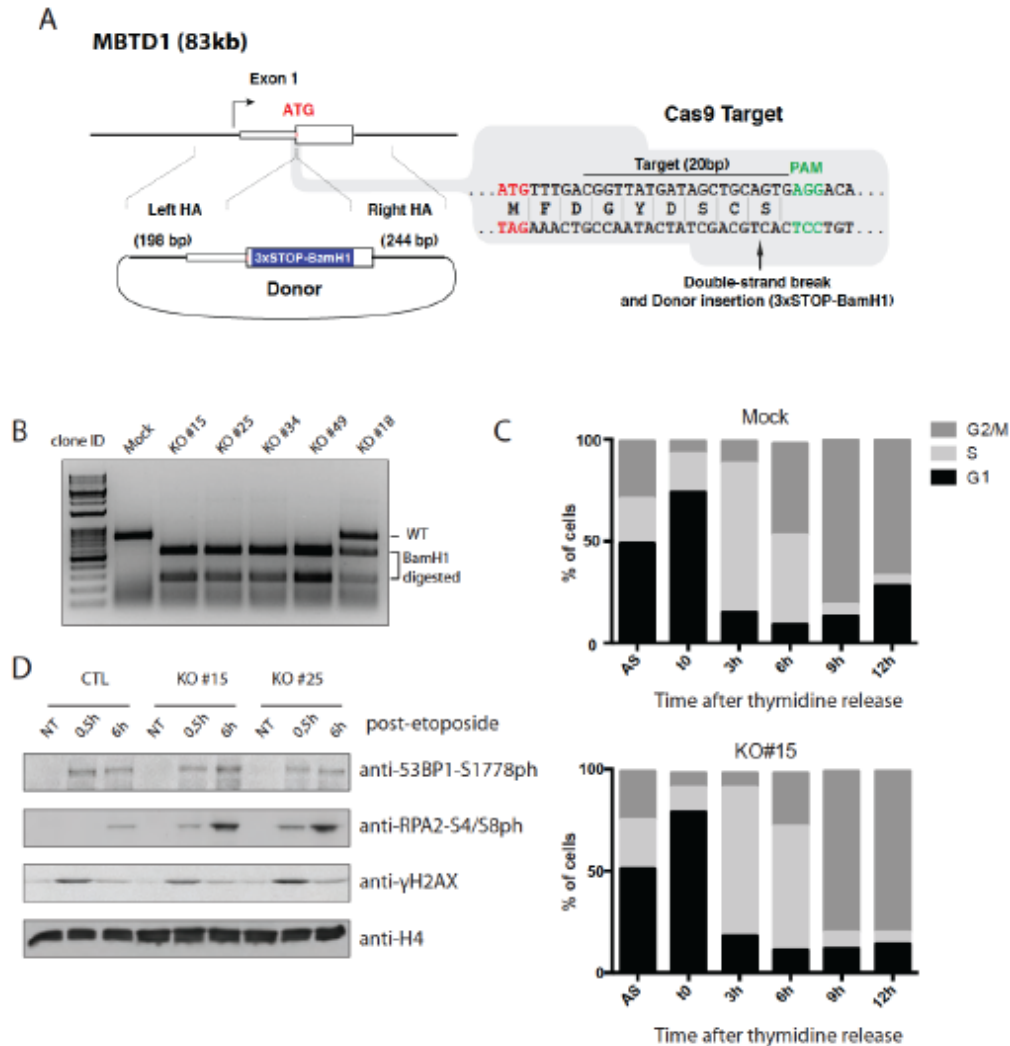


Figure 3.S5: Validation and analysis of MBTD1 KO cell lines produced by CRISPR/Cas9

(A) Genomic editing with the CRISPR/Cas9 system for knock out of MBTD1. Schematic of the *MBTD1* locus, Cas9 target site and donor construct used to insert the cassette containing 3 degenerated stop codons in the first exon after the ATG start. Annotated are the positions of the start, the target site, the PAM motif and homology arms left and right (HA-L and R). The donor also contains a BamH1 restriction site used for the screening. **(B)** Identification of MBTD1 KO clones. Results of a PCR-based screening to detect targeted integration in single-cell-derived U2OS clones (no drug selection). Primers are located outside of the homology arms and are designed to produce 2 fragments after BamH1 digestion of the PCR product if the cassette is inserted. Four homozygote KO clones and one heterozygotes are shown. Alleles were also sequenced to verify the accurate incorporation of the donor (data not shown). **(C)** MBTD1 KO cells show a delay during S phase. Cells were synchronized by double thymidine block, released for the indicated times and analyzed by FACS. Clone #15 is shown here as a representative example. **(D)** Western blot analysis of MBTD1 KO cells after etoposide treatment. Indicated antibodies were used on whole cell extracts from cells before treatment (NT) or after 0.5 and 6h (related to Figure 3.5).

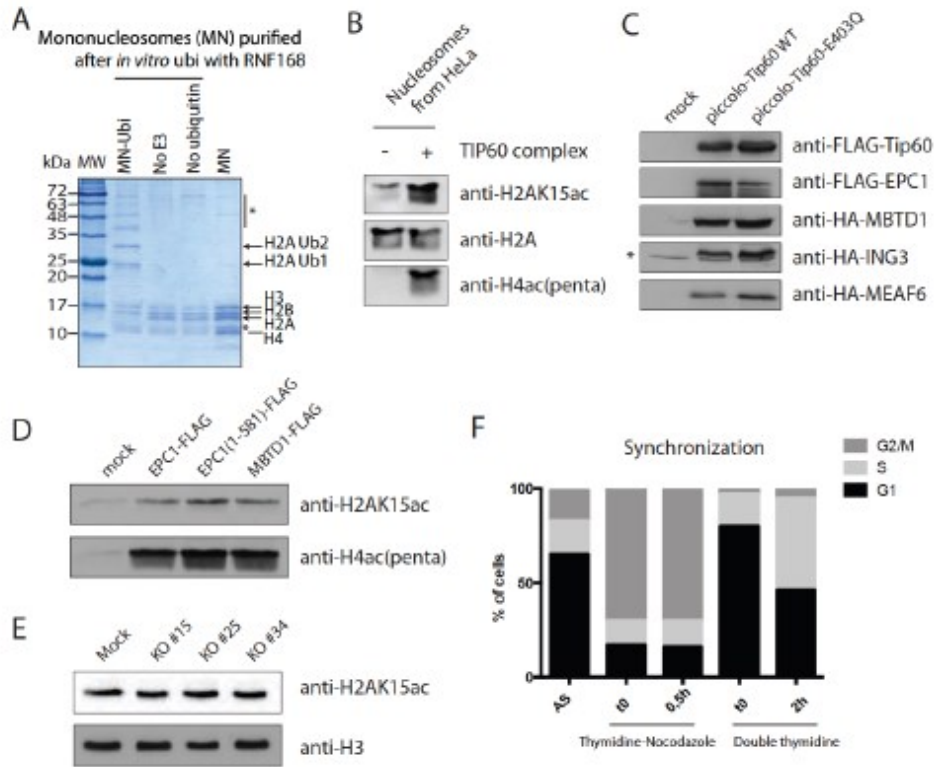


Figure 3.S6: Interrelation between TIP60 and H2AK15 modifications

(A) Coomassie stained gel of mononucleosomes (Gupta et al., 2014) purified from HeLa cells and ubiquitylated *in vitro* on H2AK13/15 using purified E1-Uba1, E2-Ubc5Ha and RNF168 as E3 ligase. The specific shift in size of histone H2A is clearly visible. The MN were used as substrates for *in vitro* acetylation assays in Fig. 3.6A. (B) H2AK15 is acetylated by the TIP60 complex on nucleosomes *in vitro*. Native nucleosomes purified from HeLa cells were used as substrate for *in vitro* HAT assays with purified native TIP60 complex (EPC1-3xFLAG, Fig. 3.1) and analyzed by western blotting with anti-H2AK15ac, anti-H2A and anti-H4ac. (C) Western blot analysis of piccolo-TIP60 subcomplex overexpressed in 293T cells after transient transfection. (D) MBTD1 does not specifically target the TIP60 complex to acetylate H2AK15. *In vitro* acetylation assays with purified native complexes from figure 3.1 revealed by western blot. TIP60 complexes purified through EPC1 (full length or (1-581)) or MBTD1 show similar activity towards H2AK15 on chromatin purified from HeLa cells. (E) H2AK15ac is not affected in MBTD1 KO cells. Acid extracted histones from the different KO cells and control were analyzed by western blot. (F) Cell cycle distribution of U2OS cells after cell cycle synchronization by double thymidine or thymidine and nocodazole blocks. 1: asynchronous cells; 2: thymidine-nocodazole block at t0; 3: thymidine-nocodazole block and release for 30 min; 4: double thymidine block at t0; 5: thymidine-nocodazole block and release for 2h (related to Figure 3.6).

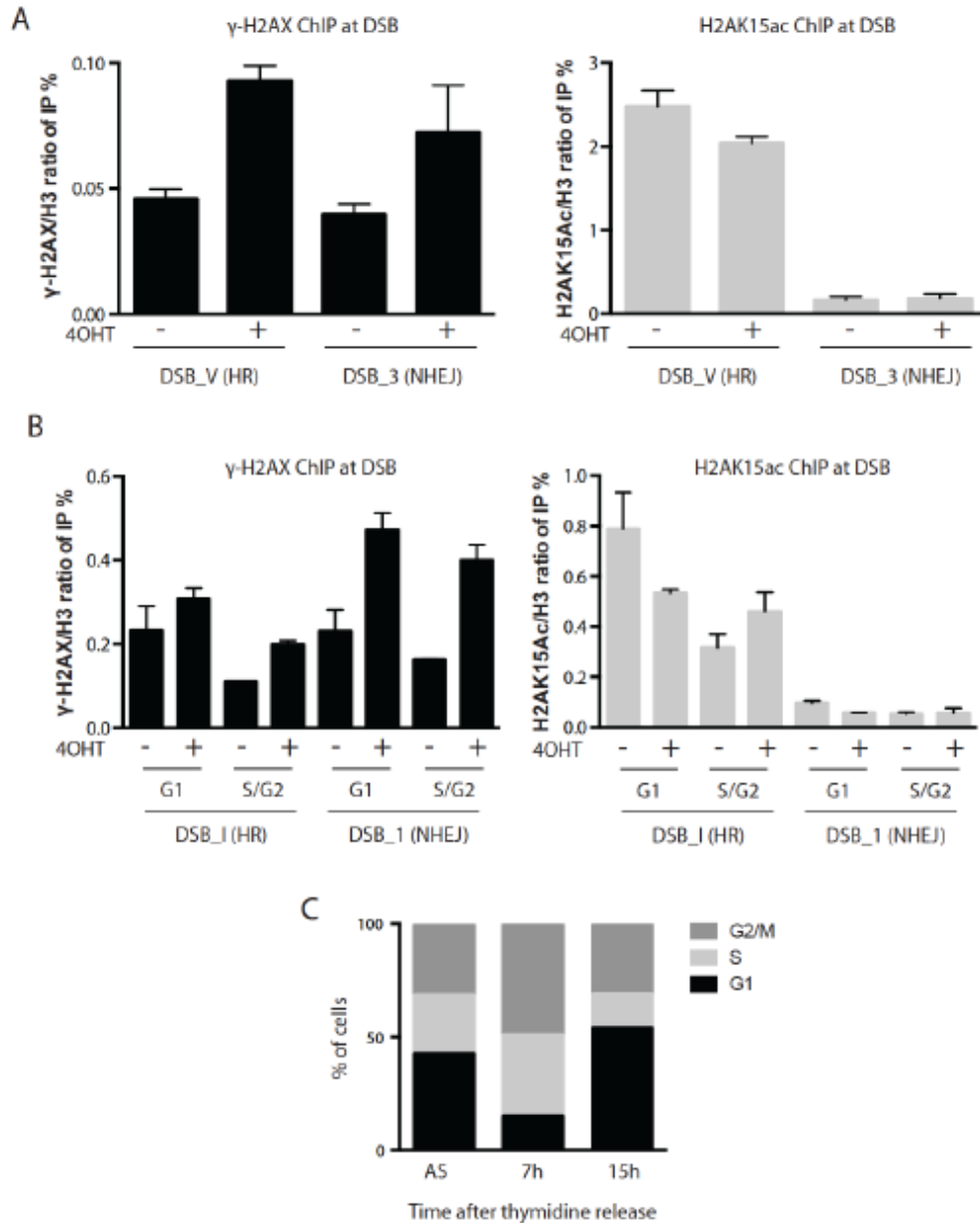


Figure 3.S7: Acetylation of H2AK15 by the TIP60 complex during the DDR

(A) γ -H2AX and H2AK15ac ChIP experiments in AID-DivA FLAG-empty asynchronous cells before and after treatment with 4OHT. Signals are presented as a ratio of IP % on total H3 to correct for nucleosome occupancy. qPCR for two DSB loci are shown (DSB V favors HR while DSB 3 favors NHEJ). (B) H2AK15 is acetylated at pro-HR DSB in S/G2 cells. γ -H2AX and H2AK15ac ChIP experiments in AID-DivA FLAG-empty cells after synchronization by double thymidine block and +/- 4OHT. qPCR for two other DSB loci are shown (DSB I favors HR while DSB 1 favors NHEJ). (C) Cell cycle distribution of U2OS AID-DivA cells after cell cycle synchronization by double thymidine block (related to Figure 3.7).

Table 3.S1: MBTD1 co-purifies with the native TIP60 acetyltransferase complex

Tandem mass spectrometry analysis of native TIP60/NuA4 complex purified through Tip60/KAT5-FLAG or EPC1-FLAG and identification of MBTD1 as a potential new component of the complex.

Mass spectrometry analysis of the purified wild-type EPC1-3xFLAG and mutant EPC1(1-581)-3xFLAG fractions also shows the specific and unique loss of MBTD1 in the TIP60 complex lacking EPC1 C-terminus. Related to Figure 3.1.

Protein name	Tip60-3xFLAG		EPC1-3xFLAG			
	# peptides	%	Full length		Truncation (1-581)	
			# peptides	coverage	# peptides	coverage
TRRAP	153	36	369	48.6	443	54.2
EP400	97	33.1	253	45.4	308	46.9
BRD8	23	27.1	67	36.8	65	38.9
EPC1	18	32.5	73	43.2	60	36.4
EPC2	28	37.5	0	0	0	0
MBTD1	14	63.6	33	31.1	0	0
DMAP1	14	78.6	64	56.3	70	63.8
KAT5/Tip60	19	24.2	63	48.5	84	54.6
ING3	11	31.7	34	27.5	33	38.8
RUVBL1	47	26.9	146	63.2	160	63.4
RUVBL2	60	27.7	232	77.5	314	78.4
VPS72	8	11.5	23	42.9	24	33.2
BAF53a	12	30.2	47	45.9	75	50.3
ACTB	16	29.7	58	62.7	53	59.7
MRG15	4	42.3	25	53.9	36	45.3
MRGX	3	31.8	21	45.8	17	30.9
MRGBP	7	20.6	7	13.7	12	18.1
YEATS4	11	47.2	28	54.2	26	50.7
MEAF6	7	9	14	28.4	14	31.8
H2B	1	22.7	0	0	0	0
H2AZ	1	11.9	2	29.7	4	29.7

Table 3.S2: MBTD1 is exclusively associated with the TIP60 complex

Mass spectrometry analysis of proteins that co-purify with MBTD1-3xFLAG. The total number of peptides identified as well the percentage of protein coverage are indicated. MBTD1 was purified from K562 cells expressing the cDNA after integration at the AAVS1 safe harbor (Fig. 3.S1) and also from K562 cells in which the endogenous genes has been tagged at the C-terminus using CRISPR/Cas9 (Dalvai et al., 2015) (related to Figure 3.1).

Protein name	AAVS1		CRISPR	
	# peptides	% coverage	# peptides	% coverage
TRRAP	1210	76	288	31
EP400	835	67	308	27
BRD8	198	50	55	23
EPC1	178	41	59	29
EPC2	175	75	56	31
MBTD1	178	70	117	36
DMAP1	177	81	63	44
KAT5/Tip60	181	71	50	20
ING3	98	77	24	21
RUVBL1	406	89	100	55
RUVBL2	612	92	144	54
VPS72	73	54	25	21
BAF53a	161	65	15	15
ACTB	71	39	64	37
MRG15	55	68	20	38
MRGX	50	70	14	31
MRGBP	43	45	4	14
YEATS4	68	74	22	37
MEAF6	35	43	14	22
H2B	15	47	4	28
H2AZ	2	15	2	8

Table 3.S3: High confidence binding sites of the TIP60 complex in the genome of K562 cells

List of 368 chromosomal loci commonly detected in ChIP-seq experiments using Tip60-3xFLAG, EPC1-3xFLAG and MBTD1-3xFLAG cell lines. The closest neighboring gene is indicated as well as the distance. Also listed are the 160 loci out of 368 that were not detected in the EPC1(1-581)-3xFLAG ChIP-seq experiment (related to Figures 3.2 and 3.S2).

Data available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>

Table 3.S4: Microarray/expression analysis of MBTD1 KO in U2OS cells

Genome-wide expression analysis of MBTD1 KO cells was performed on three different clones (, 25 and 34, see figure 3.S5), and compared for three mRNA samples from control cells (U2OS). The list of genes significantly down/up-regulated in all three KO clones is presented. Importantly, the transcription profiles of the three independent KO clones cluster closely together on a PCA plot (related to Figure 3.5).

Data available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>

Table 3.S5: Microarray/expression analysis of MBTD1 KO in U2OS cells

Histone marks enriched in genes that are downregulated in MBTD1 KO cells (ENCODE Histone modifications 2015; EnrichR) (related to figures 3.5 and 3.S4).

Term	P-value	Adjusted P-value	Z-score	Combined Score
H4K20me1	1,50986E-06	0,000572236	-1,617444288	12,07577175
H3K36me3	0,000110174	0,010439026	-1,911573266	8,720987231
H3K79me3	6,81687E-05	0,010439026	-1,639879011	7,481462611
H3K79me2	0,000377424	0,028608735	-1,598735039	5,681973387
H3K4me3	0,001820919	0,046008554	-1,670192373	5,142401987
H3K4me1	0,001820919	0,046008554	-1,66358049	5,122044476
H3K27ac	0,001820919	0,046008554	-1,657898705	5,104550667

Table 3.S6: Microarray/expression analysis of MBTD1 KO in U2OS cells

Transcription factors enriched on genes that are downregulated in MBTD1 KO cells (ENCODE Transcription Factors ChIP-seq 2015; EnrichR) (related to figures 3.5 and 3.S4).

Term	P-value	Adjusted P-value	Z-score	Combined Score
MYC	2,94953E-10	2,27999E-07	-1,510631479	23,10348363
MAX	4,39213E-08	1,69756E-05	-1,702754949	18,70260805
GATA2	2,88449E-06	0,000445942	-1,734140805	13,37945247
POLR2A	2,88449E-06	0,000445942	-1,61166773	12,43453342
KAT2A	6,63291E-06	0,00085454	-1,7183473	12,14003379
NELFE	5,97111E-05	0,004615671	-1,780747473	9,577390671
FOSL1	7,48662E-05	0,005247956	-1,809467267	9,499552383
PBX3	3,03824E-05	0,002889492	-1,611685259	9,422999026
USF2	0,000115709	0,005247956	-1,689888106	8,871771752
TAF1	8,68434E-05	0,005247956	-1,667373528	8,753572093
SP1	0,00012301	0,005247956	-1,656597896	8,697000919
SIN3A	0,000133142	0,005247956	-1,647678961	8,650177255
TAL1	0,000115709	0,005247956	-1,613987228	8,473298465
REST	9,88683E-05	0,005247956	-1,604957972	8,425895622
GATA3	0,00055439	0,011943929	-1,870953841	8,283708338
IRF3	0,00031936	0,010031459	-1,696833387	7,808876767
USF1	0,000385918	0,011048686	-1,659622962	7,47733794
SMC3	0,000602604	0,011943929	-1,679138597	7,434440173
FOS	0,000633465	0,012241716	-1,66247993	7,319742493
TCF7L2	0,000602604	0,011943929	-1,638072894	7,252620452
JUN	0,000240151	0,008276618	-1,5119724	7,248880889

Table 3.S7: Microarray/expression analysis of MBTD1 KO in U2OS cells

Correlation of transcription profiles of specific gene perturbation with genes downregulated in MBTD1 KO cells (Single gene perturbations from GEO down 2015; EnrichR) (related to figures 3.5 and 3.S4).

Term	P-value	Adjusted P-value	Z-score	Combined Score
HDAC2 KD human GSE52232 sample 2890	2,5808E-19	4,3255E-16	-1,66185752	58,79125818
OGT small molecule inhibition human GSE44624 sample 1838	4,2059E-17	3,52456E-14	-1,726997263	53,4962187
BRCA1 DEPLETION human GSE4754 sample 148	1,5592E-14	2,90354E-12	-1,888519145	50,16867872
RAF1 overexpression human GSE42964 sample 1982	7,0874E-16	2,0585E-13	-1,700136609	49,66375736
BRAF Drug human GSE50791 sample 2541	8,5976E-16	2,0585E-13	-1,699980669	49,65920211
BRAF Drug human GSE50791 sample 2545	7,3684E-16	2,0585E-13	-1,692250284	49,43338497
SMARCB1 OE human GSE35909 sample 1420	7,6943E-15	1,61195E-12	-1,796577554	48,78350942
GAPDH KD human GSE15723 sample 2242	8,2739E-16	2,0585E-13	-1,663815739	48,60276563
Zmpste24 KD mouse GSE41799 sample 2919	5,3781E-16	2,0585E-13	-1,640460281	47,92051469
KDR KD human GSE61178 sample 2589	1,3031E-13	1,81998E-11	-1,758137363	43,47804923
BCAR1 OE human GSE43907 sample 2244	2,2607E-13	2,91451E-11	-1,781178328	43,20913436
OGT small molecule inhibition human GSE44624 sample 1834	9,7828E-14	1,49054E-11	-1,69764597	42,32112223
GAPDH KD human GSE15723 sample 2241	2,9592E-14	4,95957E-12	-1,62324428	42,25256502
Cd53 OE mouse GSE46600 sample 250	5,3172E-11	4,35826E-09	-1,958274006	37,69911068
PRKCDBP KD human GSE50982 sample 1768	1,6573E-12	1,984E-10	-1,673976135	37,39785889
DOT1L INHIBITION - EPZ004777 human GSE29828 sample 1239	1,0031E-11	1,0507E-09	-1,789363689	36,99295694
NANOG OE human GSE34920 sample 1421	2,8978E-12	3,23784E-10	-1,672477062	36,54520425
ARHGDI1 KD human GSE8087 sample 661	2,4255E-11	2,25839E-09	-1,754701283	34,93366968
KRAS oncogenic KRAS mutation human GSE17643 sample 2625	1,8449E-11	1,8189E-09	-1,636786628	32,94038822
Trim12a OE mouse GSE46600 sample 246	6,9687E-10	3,76762E-08	-1,909205088	32,63640482
ZNF395 KD human GSE49613 sample 813	5,1509E-11	4,35826E-09	-1,682622351	32,39248749
Tmem87a OE mouse GSE46600 sample 243	6,1175E-10	3,41762E-08	-1,882517699	32,36374623
Krt1 KO mouse GSE32951 sample 2776	1,4675E-10	1,11797E-08	-1,75389378	32,11233082

4. Chapitre 4 : Lien entre l'acétylation du chromodomaine de Tip60/KAT5 et la réponse aux dommages de l'ADN

Avant-propos

Ce projet a été mené en parallèle d'une autre étude portant sur l'auto-acétylation des complexes de la famille MYST (Rossetto et al. appendice 9; manuscrit soumis à JBC). Cette première étude porte notamment sur des résidus d'Esa1/KAT5 chez la levure, autoacétylés au sein du domaine catalytique MYST, et conservés chez Tip60. De plus, des analyses par spectrométrie de masse ont identifié la lysine 52 acétylée chez l'humain (Choudhary et al., 2009; Peng et al., 2012). Ce projet a débuté par l'observation que le complexe TIP60 est fortement déacétylé après induction de dommages sur l'ADN. De plus, Dorine Rossetto a pu observer que l'acétylation constitutive du résidu homologue à K52 chez la levure affecte fortement la survie.

Ces travaux restent encore préliminaires et l'avancée du projet a été ralentie par l'impossibilité de détecter l'acétylation du résidu *in vivo* par spectrométrie de masse dans nos conditions. De plus, l'utilisation d'un anticorps K52-acétyl-spécifique (produit à notre demande) s'est révélée infructueuse jusqu'à ce jour. D'autre part, pendant la réalisation de ces travaux, d'autres équipes ont publié des travaux similaires sur l'acétylation de Tip60 (Peng et al., 2012; Yang et al., 2012). En d'autres termes, nos résultats bien qu'encore préliminaires semblent corrélés avec des études proches de nos travaux, effectuées dans d'autres laboratoires. Finalement, le groupe de Steve Jackson a étudié la phosphorylation de la tyrosine 44 au sein du chromodomaine de Tip60 (Kaidi and Jackson, 2013).

4.1 Introduction

Récemment, il a été montré que les acétyltransférases de la famille MYST Sas2, MOF et Esa1 subissent une étape préalable d'autoacétylation au sein de leur domaine catalytique afin de modifier ensuite leur substrat au sein de la chromatine (Yuan et al., 2012). Ce mécanisme d'autoacétylation est commun aux enzymes de la famille MYST et semble indispensable au fonctionnement de leurs complexes (Rossetto et al en préparation). De plus, la déacétylation de ces résidus de Tip60 et Mof par SIRT1 a été suggéré chez l'humain (Peng et al., 2012; Yang et al., 2012). De manière intéressante, l'acétylation de Tip60 semble régulée en réponse à des dommages de l'ADN (Peng et al., 2012). Cette dynamique d'acétylation pourrait impacter le recyclage de γ H2AX et l'induction de l'apoptose (Yamagata and Kitabayashi, 2009). De plus HDAC3, une autre déacétylase impliquée dans la maintenance du génome, semble aussi impliquée dans la régulation de Tip60 (Yi et al., 2014). En dehors du domaine catalytique, la phosphorylation du chromodomaine de Tip60 semble finalement importante pour l'activation d'ATM (Kaidi and Jackson, 2013). Nous nous sommes intéressés ici à l'acétylation d'un résidu conservé au sein du chromodomaine de Tip60 et de son impact sur la liaison à la chromatine et la fonction de TIP60 durant la réponse aux dommages de l'ADN.

4.2 Résultats

4.2.1 Dynamique de phosphorylation et de déacétylation du complexe TIP60 en réponse à des dommages sur l'ADN

Nous savons qu'il existe une relation étroite entre TIP60 et ATM durant la DDR (chapitre 1). De plus, NuA4 est phosphorylé par Mec1/Tel1 durant la DDR (Jobin-Robitaille et al en préparation) alors que son acétylation semble stable (Rossetto et al appendice 9). Nous avons donc voulu étudier les PTM du complexe TIP60 en réponse à des dommages sur l'ADN (figure 4.1A). Pour cela, nous avons purifié le complexe natif à partir de cellules humaines traitées avec des agents induisant des dommages (figure 4.1 A). La daunorubicine est une molécule de la famille des anthracyclines qui va induire des cassures double-brin de l'ADN. Elle agit à 2 niveaux: c'est à la fois un intercalant de l'ADN et un inhibiteur de la Topoisomérase II. De manière inattendue, nous avons pu observer un effet modéré sur la phosphorylation détectée par western blot avec un anti-phospho-sérine/thréonine-Q (spécifique de la séquence consensus ciblée par les kinases ATR/ATM) mais une déacétylation globale du complexe révélée par un anticorps anti-acétyl-lysine, en réponse à la daunorubicine (figure 4.1 B).

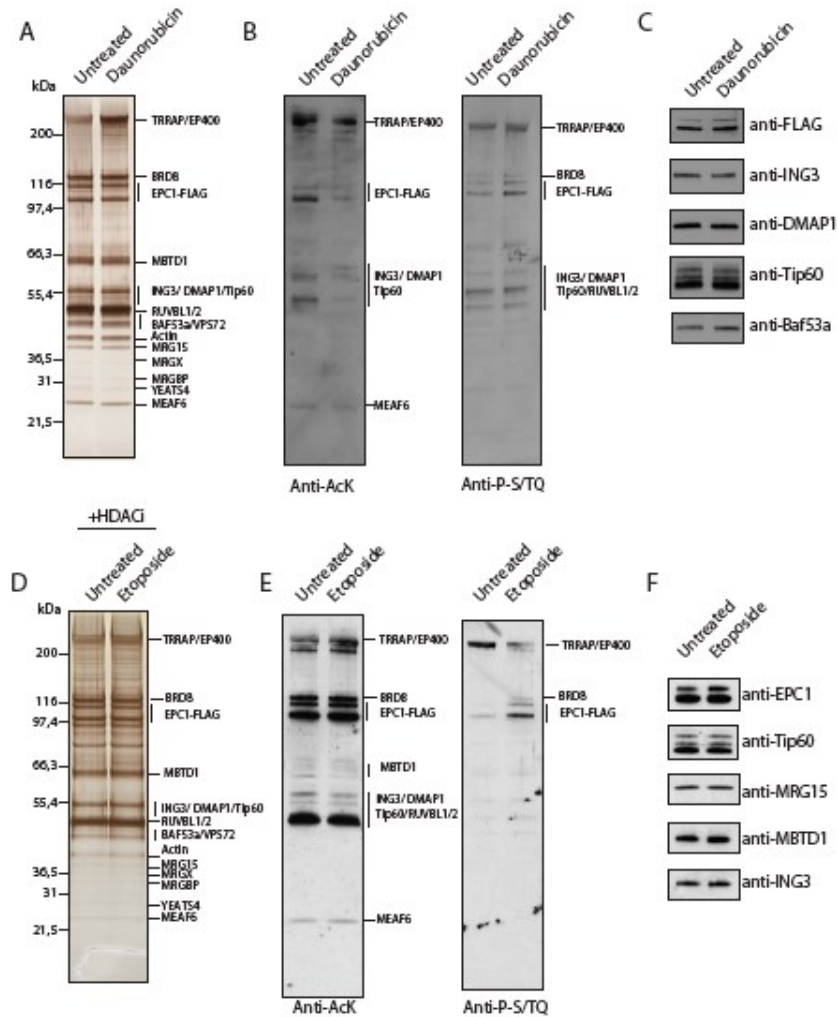


Figure 4.1: Dynamique d'acétylation et de phosphorylation du complexe TIP60 en réponse à des dommages de l'ADN.

(A) Purification du complexe TIP60 après traitement avec un agent endommageant l'ADN. Le complexe TIP60 natif a été purifié à travers EPC1-3xFLAG en K562 (lignée AAVS1, voir chapitre 3) avec ou sans traitement à la daunorubicine (0,25 μ M, 24h) et analysé sur gel coloré à l'argent. (B) Le complexe TIP60 purifié à partir de cellules traitées à la daunorubicine montre des profils différentiels d'acétylation et de phosphorylation. Analyses par western blot anti-acétyl-lysine (à gauche) et anti-phospho-S/T-Q (à droite; motif spécifique des kinases ATM-ATR) après normalisation sur l'activité HAT *in vitro*. (C) Analyse par Western blot des complexes TIP60 purifiés en (A) avec les différents anticorps indiqués. (D) Purification du complexe TIP60 après traitement par un agent endommageant l'ADN dans un contexte de blocage de la déacétylation. Le complexe TIP60 a été purifié à partir de la lignée EPC1-3xFLAG (en A) après traitement par etoposide (1h, 50 μ M) précédé par un pré-traitement avec des inhibiteurs de lysines déacétylases nicotinamide et sodium butyrate de 12h (10mM et 40ng/mL respectivement) et analyse sur gel coloré à l'argent. (E) Le traitement aux inhibiteurs de HDAC bloque la dynamique de déacétylation du complexe et affecte le profil de phosphorylation. Analyse par western blot anti-acétyl-lysine (à gauche) et

anti-phospho-S/T-Q (à droite) après normalisation sur l'activité HAT *in vitro*. (F) Analyse par Western blot des complexes TIP60 purifiés en (D) avec les anticorps indiqués.

Le complexe purifié après dommage est aussi actif sur la chromatine *in vitro* que son contrôle purifié sans dommages (données non montrées). Bien que l'autoacétylation de Tip60/Kat5 soit nécessaire à son activité acétyltransférase (Yuan et al., 2012)(Rossetto et al; appendice 9), la déacétylation du complexe après dommage suggère qu'il existe une dynamique d'acétylation du complexe qui pourrait réguler sa fonction. Nous avons donc bloqué cette dynamique en traitant les cellules avec des inhibiteurs de KDAC à large spectre (figure 4.1 D). De manière intéressante, le traitement à la TSA et nicotinamide bloque bien la déacétylation suite aux dommages mais impacte aussi le signal de phosphorylation du complexe (figure 4.1 E). EPC1 semble plus fortement phosphorylé alors que le signal autour de 50kDa, qui correspond potentiellement à Tip60, a disparu. Ceci suggère que la déacétylation de Tip60 pourrait être un prérequis à sa phosphorylation en réponse aux dommages par les kinases ATM/ATR. Là encore les complexes ne montrent pas de différences d'activité *in vitro* (données non montrées).

Un impact du cycle cellulaire est cependant à considérer ici possiblement dû à l'utilisation de la TSA qui provoque un blocage en G2/M. Dans cette expérience, nous avons utilisé l'etoposide qui est aussi un inhibiteur de Topoisomérase II. Les résultats de la figure 1 ne sont donc pas exactement comparables, mais suggèrent une tendance similaire qui devra être confirmée. L'analyse par MS de TIP60 a permis d'identifier des résidus potentiellement régulés de manière différentielle sur de nombreuses sous-unités qu'il sera intéressant d'étudier plus en détail (voir figures supplémentaires 4). Il sera aussi intéressant d'effectuer la purification de TIP60 dans les différentes phases du cycle cellulaire après synchronisation pour l'analyse de la phosphorylation et de l'acétylation.

4.2.2 L'acétylation du chromodomaine sur le résidu K52 affecte l'activité du complexe *in vitro*

Bien que nos analyses en MS n'aient pas permis de l'identifier, nous avons choisi d'étudier le rôle de l'acétylation de K52. En effet, ce résidu est conservé chez Esa1 et se situe au sein d'un domaine fonctionnel (figure 4.3 A). De plus selon la structure 3D du domaine, ce résidu se trouve dans une boucle du chromodomaine à sa surface, donc accessible pour une éventuelle KDAC et possiblement impliquée dans la spécificité de reconnaissance de marque de la chromatine (Huang and Tan, 2013).

Nous avons donc établi des lignées cellulaires dans le système AAVS1 afin de purifier le complexe TIP60 natif via Tip60/KAT5-3xFLAG sauvage ou mutant pour K52, et effectuer des analyses *in*

in vitro (figure 4.2 A). Dans un premier temps, nous avons confirmé l'intégrité des différents complexes (figure 4.2 B). Ainsi qu'attendu, la mutation de K52 n'affecte pas la composition du complexe en terme de sous-unités.

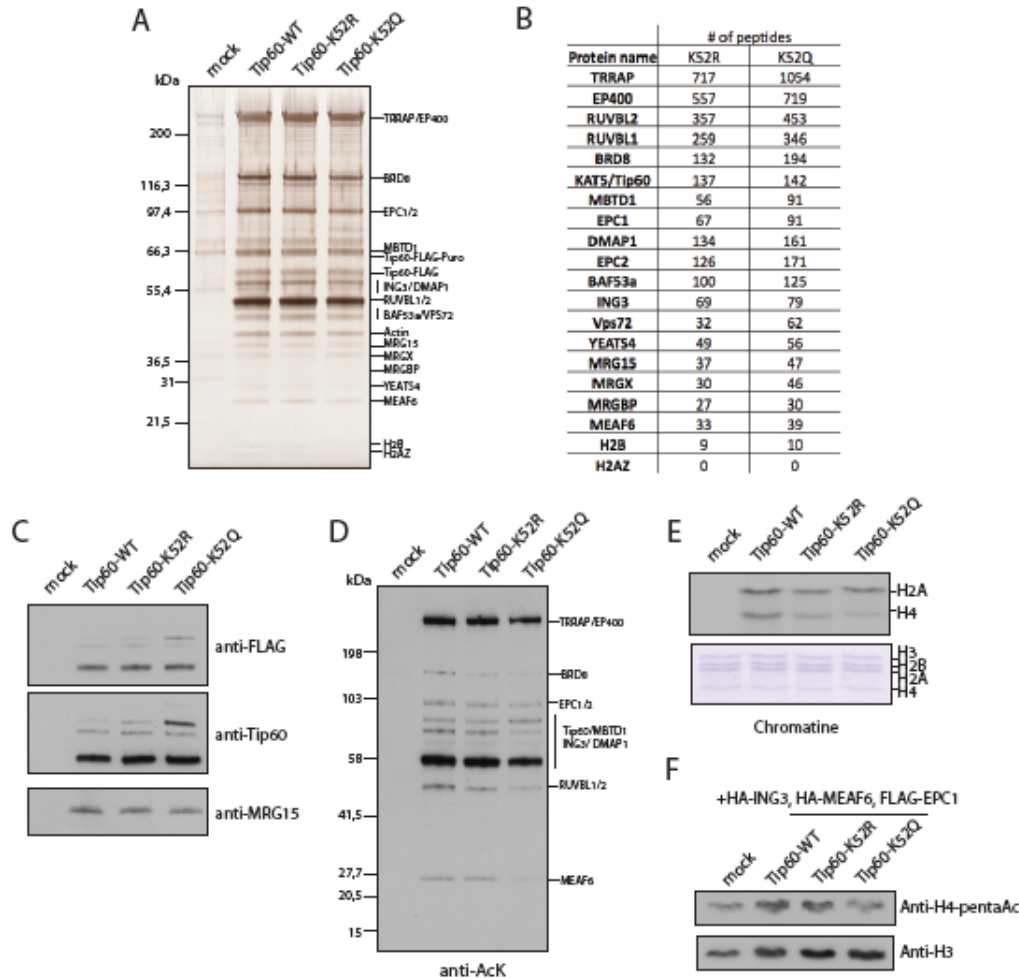


Figure 4.2: L'acétylation de Tip60 sur la lysine 52 au sein du chromodomaine affecte l'activité de TIP60. (A) Purification du complexe TIP60 contenant Tip60/KAT5 (isoforme PLIP ou Tip60 β) mutant pour la lysine 52. Le complexe TIP60 natif a été purifié à travers Tip60-3xFLAG WT, K52R et K52Q en K562 (lignées AAVS1, similaires à la figure 4.1; voir chapitre 3). La lignée mock est utilisée comme contrôle négatif (voir chapitre 3). Les différents clones ont été choisis pour leur expression similaire (voir figure 4.4). (B) La mutation de K52 n'affecte pas la composition du complexe. Analyse par spectrométrie de masse des complexes purifiés en (A). L'identification des sous-unités suivie par l'analyse des modifications posttraductionnelles a été ciblée en particulier sur la protéine Tip60. (C) L'acétylation de Tip60 sur K52 semble affecter d'autres PTM. L'analyse de Tip60 par western blot montre une modification du profil de migration du mutant K52Q. (D) L'acétylation de Tip60 sur K52 impacte le profil d'acétylation global du complexe. L'analyse du profil d'acétylation du complexe natif par Western blot anti-acK montre que la mutation K52Q diminue significativement le niveau d'acétylation du complexe sur plusieurs sous-

unités. (E) L'acétylation de K52 régule potentiellement le ciblage de la chromatine. Essai d'acétylation *in vitro* (autoradiogramme en haut) sur la chromatine native (Coomassie en bas) avec les complexes purifiés en (A) après normalisation de l'activité HAT sur histones libres. (F) L'acétylation dans le chromodomaine de Tip60 semble affecter l'acétylation de H4 *in vivo*. Analyse par Western blot des histones endogènes après surexpression transitoire de piccolo-TIP60 (EPC1, MEAF6, ING3 et Tip60-WT-K52R ou K52Q).

L'analyse du complexe par western blot montre que le profil de migration de Tip60 semble affecté suggérant un effet sur d'éventuelles PTM de la protéine (figure 4.2 C). L'acétylation n'affecte pas la migration sur gel néanmoins le profil d'acétylation des différents complexes a été analysé par western blot anti-acétyl-K (figure 4.2 D). On peut observer une diminution générale de signal dans le complexe comprenant le mutant K52Q. Alors que pour Tip60, ce résultat est attendu puisque que l'on utilise un mutant de K52 (et qu'une glutamine ne peut être reconnue comme une lysine acétylée par l'anticorps utilisé; données non montrées), cette diminution touche également d'autres sous-unités comme EP400/TRRAP ou MEAF6. L'autoacétylation a lieu en *cis* et en *trans* (Rossetto et al., en préparation). Or les cellules contiennent une copie sauvage de Tip60, donc la perte de signal provient d'une perte d'autoacétylation en *cis*.

L'impact sur l'activité a ensuite été étudié via des essais d'acétylation *in vitro*. L'activité HAT des complexes a été normalisée au préalable sur des histones libres puis les mêmes essais ont été effectués sur de la chromatine native (figure 4.2 E). On peut observer que l'acétylation de H4 semble proportionnellement plus faible par comparaison à H2A dans les essais avec les mutants. De la même manière, la surexpression des mutants *in vivo* semble impacter l'acétylation de H4 (figure 4.2 F). Cet effet sur l'activité, en particulier sur H4 devra être confirmé à travers d'autres expériences (par western blot pour des résidus spécifique et utilisation du mutant HAT *dead*). Cependant un résultat identique est obtenu avec le mutant K61 chez la levure (données non montrées).

4.2.3 L'acétylation de K52 impacte la reconnaissance de la chromatine

Comme l'acétylation constitutive de K52 semble impacter l'activité de TIP60 sur la chromatine, nous avons émis l'hypothèse que selon le modèle clé-serrure, l'acétylation du chromodomaine pourrait réguler la reconnaissance de marque de méthylation de la chromatine. Nous avons donc purifié en bactérie les domaines fusionnés à la GST et effectué des expériences d'interaction avec de la chromatine native *in vitro* (figure 4.3 A, B, C). Nous avons inclus la courte séquence en N-terminale du CHD pour considérer le

domaine chromobarrel (CBD) (Huang and Tan, 2013). Ainsi l'acétylation constitutive de K52 semble réduire de manière reproductible l'interaction avec la chromatine chez Tip60. Cependant la faible interaction globale des différents domaines ne nous a pas permis d'identifier un enrichissement de marque avec des anticorps spécifiques par western blot (données non montrées).

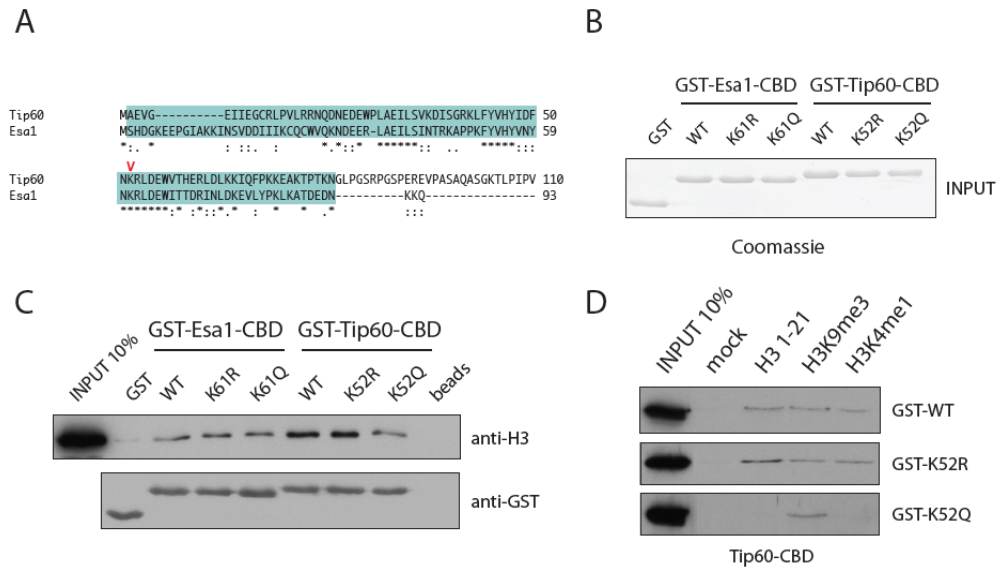


Figure 4.3: L'acétylation au sein du domaine chromobarrel (CBD) de Tip60 et Esa1 affecte l'interaction avec la chromatine *in vitro*

(A) K52 est conservée au sein du CBD d'Esa1. Alignement ClustalW2 des séquences des domaines de Tip60 et Esa1 (adapté de Doyon et al 2004). En bleu: domaine chromobarrel; flèche: résidu K52 ou K61 conservés. (B) Purification des CBDs fusionnés à la GST et normalisation par Coomassie pour les essais d'interaction. (C) L'acétylation constitutive de K52 semble défavoriser l'interaction avec la chromatine native humaine *in vitro*. Expérience d'interaction *in vitro* entre les différents domaines purifiés en bactérie et la chromatine humaine purifiée. Le CBD d'Esa1 est utilisé comme contrôle. (D) L'acétylation de K52 affecte potentiellement la reconnaissance de marque de méthylation de la chromatine. Expérience d'interaction avec des peptides H3K9me3 et H3K4me1 vs non-modifié (résidus 1 à 21). Mock: GST seule en quantité équivalente au domaine considéré (voir B).

Nous avons ensuite effectué des expériences d'interaction avec des peptides de H3 modifiés afin d'étudier l'effet sur la reconnaissance de marques de méthylation de la chromatine suggérées par la littérature (Jeong et al., 2011; Sun et al., 2009). L'acétylation de K52 semble impacter la reconnaissance de H3K4me1 et H3K9me3 (figure 4.3 D). Alors que le CBD-K52Q semble interagir uniquement avec

H3K9me3, K52R semble lier H3 de manière indépendante de sa méthylation. À noter que nous avons également effectué des expériences d'interaction avec une librairie de peptides qui n'ont pas été concluantes.

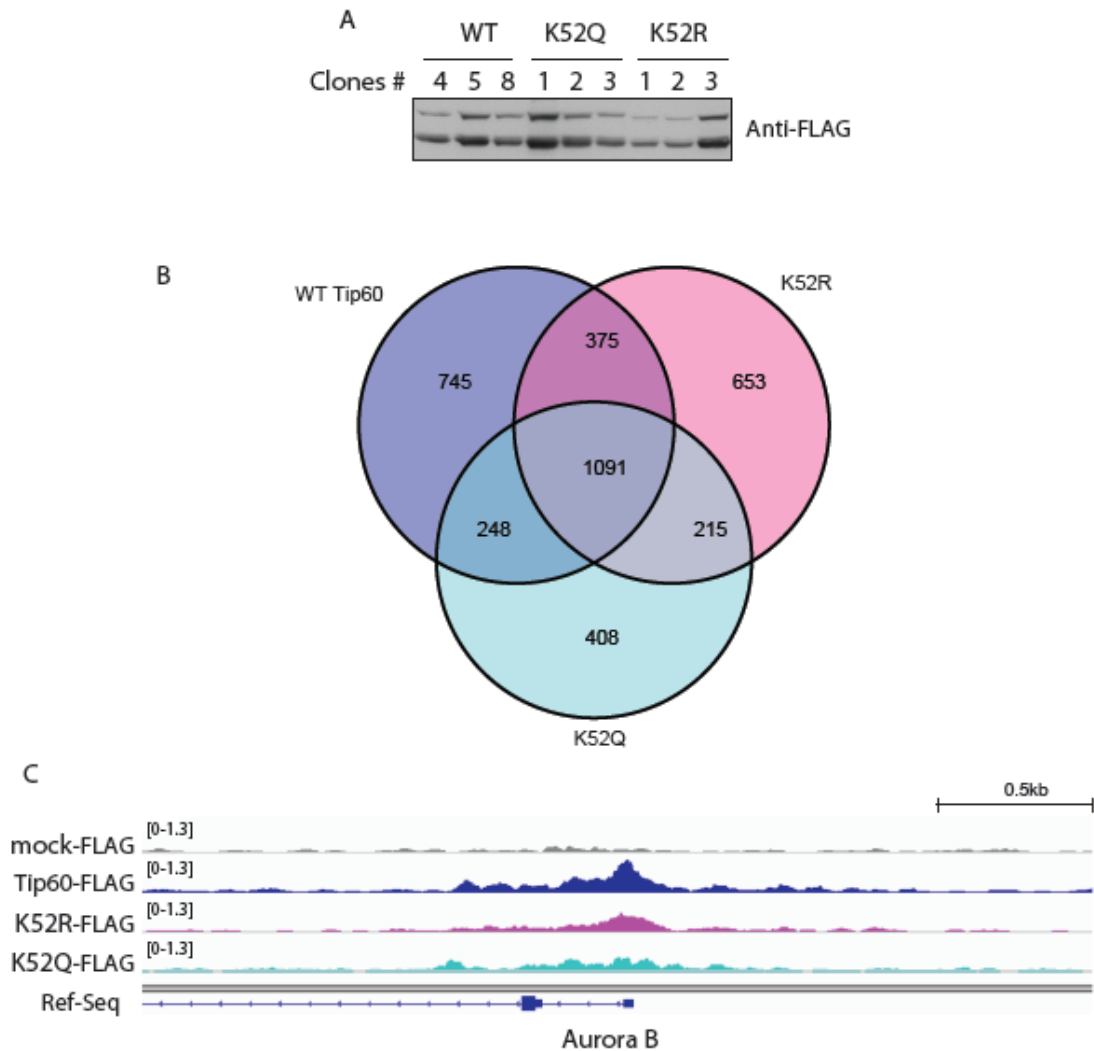


Figure 4.4: L'acétylation au sein du chromodomaine de Tip60 affecte potentiellement la localisation du complexe au sein du génome.

(A) Contrôle de l'expression des clones K562 AAVS1-Tip60-3xFLAG WT vs mutants K52R et K52Q. Identification des clones de niveau d'expression similaire de la protéine Tip60 exogène étiquetée FLAG par Western blot anti-FLAG sur des extraits cellulaires totaux. Les clones WT#5, K52R#3 et K52Q#1 ont été choisis. (B) L'acétylation de K52 affecte potentiellement la localisation du complexe à certains loci au sein du génome. Analyse par ChIP-seq anti-FLAG de la localisation de Tip60 (WT ou les mutants K52R/Q) au sein du génome entier: représentation par diagramme de Venn montrant l'ensemble des régions significativement liées par les 3 protéines par rapport au contrôle négatif (mock). Le chevauchement des 3 protéines pourrait représenter les régions liées indépendamment de l'acétylation de Tip60. Les localisations différentielles devront être analysées plus précisément afin d'identifier l'impact

de l'acétylation sur la localisation du complexe. (C) Exemple du promoteur du gène codant pour la protéine Aurora B. Les signaux de ChIP-seq pour Tip60 WT-, K52R et K52Q obtenus par immunoprécipitation anti-FLAG en K562 illustrent ici les différences obtenues [rpm: reads per million total reads].

Afin de confirmer un lien entre l'acétylation de K52 et le ciblage à la chromatine, nous avons également réalisé des expériences de ChIP-seq (figure 4.4). Les différents clones établis pour la purification de complexes natifs ont été utilisés pour effectuer des ChIP anti-FLAG en cellules K562 (figure 4.4 A; voir chapitre 3). L'analyse des données suggère que l'acétylation de K52 pourrait effectivement moduler la localisation du complexe aux promoteurs de gènes activement transcrits (données non montrées; chapitre 3; figure 4.4 B). Par exemple, le signal au TSS du gène Aurora B semble impacté dans le cas du mutant K52Q mais ces résultats restent à être confirmés (figure 4.4 C). Un parallèle avec les données de ChIP-seq de marques d'histone dans les K562 issues du projet *Encode* pourra être effectué afin de voir si une corrélation peut être observée.

4.2.4 L'acétylation de K52 joue un rôle pendant la réponse aux dommages de l'ADN

Nous avons contrôlé que les cellules exprimant les mutants K52R/Q ne présentent pas de différence de cycle cellulaire (figure 4.5 A) et montrent une croissance similaire (figure 4.5 C). Il est important de noter que les cellules possèdent leur copie endogène sauvage de Tip60. Cependant les cellules présentent une différence de marquage 53BP1 à l'état basal (figure 4.5 B). Ce marquage est représentatif de dommages endogènes potentiellement issus de stress répliatif et retrouvés en phase G1 (Lukas et al 2011).

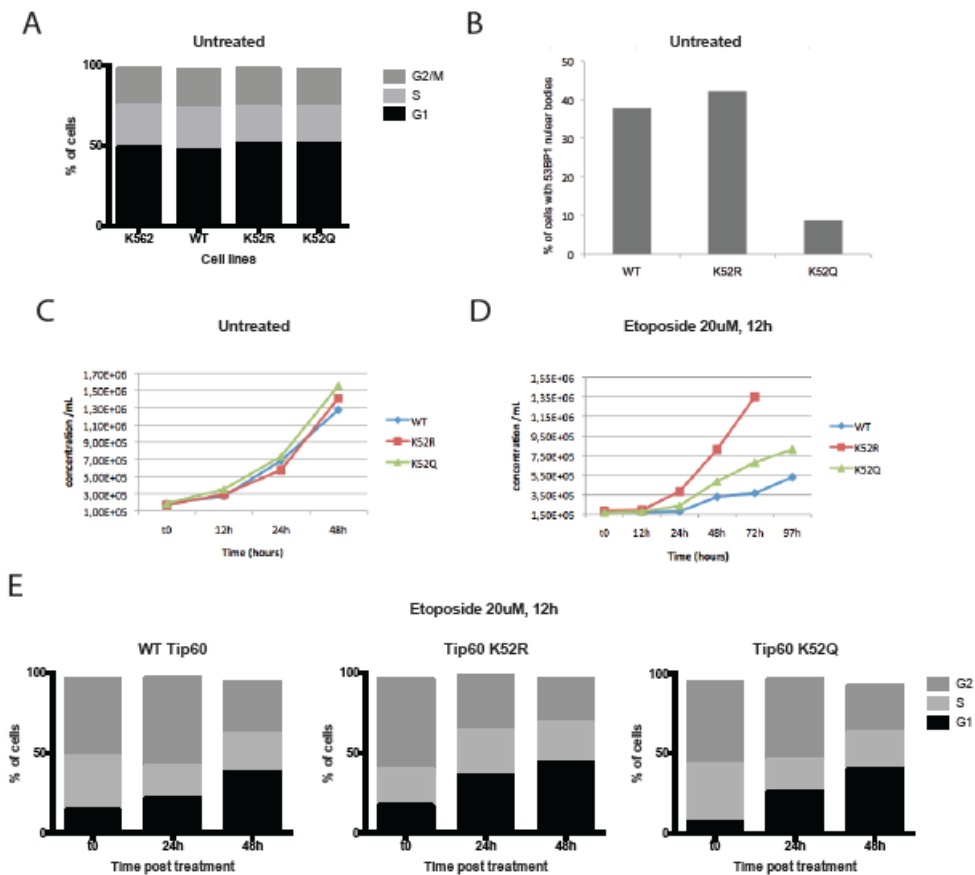


Figure 4.5: L'acétylation au sein du chromodomaine de Tip60 affecte la réponse aux dommages de l'ADN.

(A) L'acétylation de K52 n'impacte pas le cycle cellulaire en conditions normales dans les lignées K562 établies. L'analyse des cellules par FACS révèle que les cellules K562 AAVS1-Tip60-3xFLAG WT, K52R et K52Q ne présentent pas de différence de cycle cellulaire en conditions normales comparées à la lignée parentale K562. À noter que les cellules possèdent les copies sauvages endogènes. (B) Dommages endogènes dans les lignées mutantes K52. Les différentes lignées sont analysées par immunofluorescence anti-53BP1 et présentent une proportion variable de marquage 53BP1 en conditions normales. Alors que les lignées ne présentent pas de différence notable de cycle cellulaire (en A), le nombre de cellules présentant des dommages endogènes potentiellement issus de stress réplicatif semble identique, voire légèrement augmenter dans le mutant R et significativement diminuer dans le mutant Q. Ces dommages sont marqués par l'accumulation de 53BP1 sous forme de "bodies" ($n > 190$ par condition en singulat). (C) Les cellules K562 AAVS1-Tip60-3xFLAG WT, K52R et K52Q ne présentent pas de différence de croissance. Suivi de la croissance des cellules K562 (figure 4.4A) en conditions normales. Les cellules sont comptées manuellement toutes les 24h après ensemencement jusqu'à confluence. (D) Les cellules K562 AAVS1-Tip60-3xFLAG WT, K52R et K52Q répondent différemment à un traitement induisant des dommages de l'ADN. Suivi de la croissance des cellules K562 (figure 4.4A) après traitement à l'etoposide ($20\mu\text{M}$). Les cellules sont ensemencées, traitées pendant 12h puis lavées intensivement et remise en culture. Les comptages sont effectués toutes les 24h jusqu'à confluence. (E) Analyse par FACS des cellules en (C) aux points indiqués. K52R semble montrer un défaut d'activation du point de contrôle du cycle cellulaire.

En réponse à un traitement prolongé à l'etoposide, les mutants se comportent de manière opposée (figure 4.5 D). Alors que la lignée K52R montre un arrêt du cycle plus court que la lignée sauvage, la lignée K52Q se comporte comme le contrôle. Cependant elle semble atteindre un plateau et cet effet semble plus important lors d'un traitement par la daunorubicine (données non montrées). L'analyse par cytométrie en flux aux différents temps suggère que le mutant K52R présente un défaut de signalisation (figure 4.5 E). Au point 24h, les cellules K52R montrent une plus grande proportion de cellules en G1 ce qui pourrait traduire un défaut de point de contrôle G2/M. On peut se demander si les cellules ont réparé de manière efficace ou si elles accumulent des dommages non réparés dans ces conditions .

4.2.5 Chez la levure, l'acétylation de K61 joue un rôle important dans la survie

Différentes souches de levure exprimant les mutants K61R et K61Q d'Esa1 étiquetés HA ont été construites. Nous avons procédé à des tests de survie après éviction de plasmide (*plasmid shuffling*) étant donné qu'Esa1 est essentielle. Le mutant non acétylable K61R se conduit comme Esa1 WT ou le mutant K262Q, par comparaison au mutant K61Q qui montre un fort défaut de croissance (figure 4.6 A). Alors que l'acétylation de K262 est essentielle à la survie de la cellule (Yuan et al), l'acétylation constitutive de K61 semble pour sa part être toxique pour la cellule.

Les cellules survivantes ont été amplifiées et des tests de croissance ont été effectués dans différentes conditions de stress. De la même manière, le mutant K61Q semble sensible à des agents induisant des dommages de l'ADN ou de stress transcriptionnels induits par la température ou des drogues (figure 4.6 B).

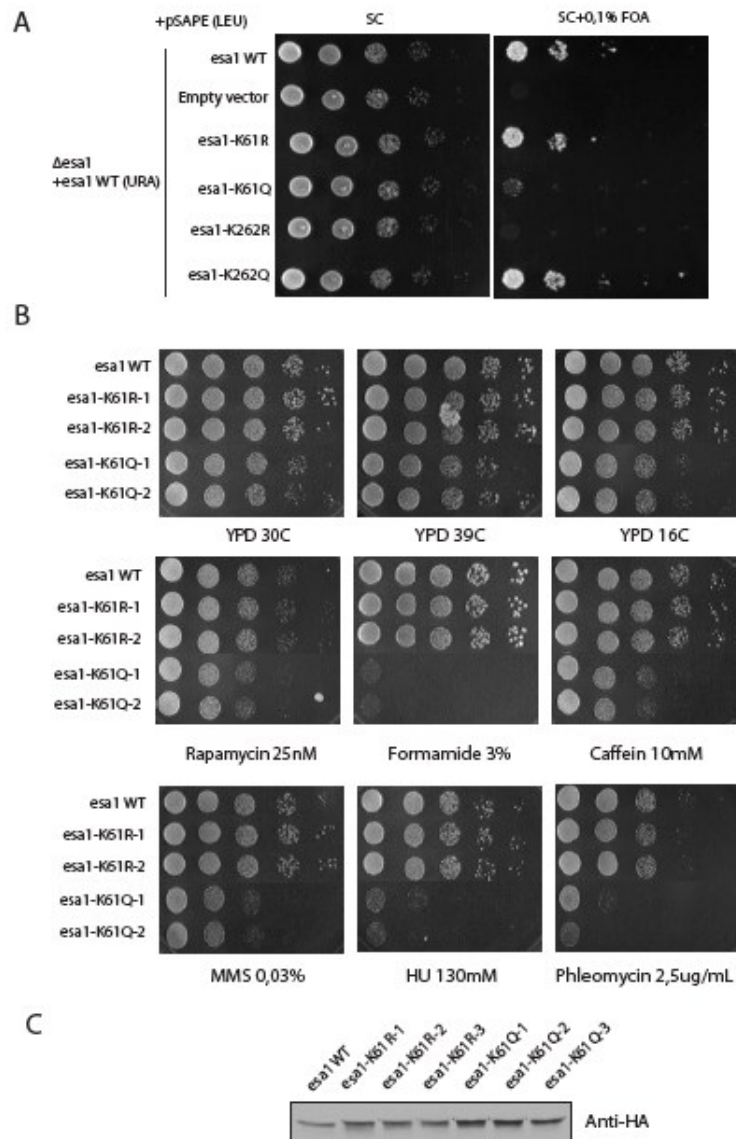


Figure 4.6: L'acétylation au sein du chromodomaine d'Esa1 affecte la survie chez la levure.

(A) L'acétylation constitutive de K61 impacte la croissance chez la levure. Test de croissance basé sur l'éviction de plasmide dans des cellules où le gène *esa1* a été délété. Les cellules sont cultivées sur 5'FOA à 30°C pour 2 à 3 jours pour contre-sélectionner le marqueur URA. Le mutant *Esa1-K61Q* montre un fort défaut de croissance comme le mutant K262R qui est utilisé comme contrôle. (B) Le mutant K61 constitutivement acétylé (K61Q) est sensible aux stress affectant la transcription et la réparation de l'ADN. Test de croissance sur rapamycine (25nM), formamide (3%), Hydroxyurée (HU; 130mM), caféine (10mM), méthyl-methane sulfonate (MMS; 0,03%), phleomycine (2,5ug/mL), ainsi qu'à 39°C et 16°C. Pour chaque mutation, 2 clones issus de l'expérience présentée en (A) sont utilisés. (C) Contrôle de l'expression des mutants d'Esa1. L'expression des différents clones utilisés est vérifiée par Western blot anti-HA à partir d'extraits RIPA sur un même nombre de cellules.

4.3 Conclusion

Le complexe TIP60 est globalement déacétylé en réponse à des dommages de l'ADN. Il est potentiellement phosphorylé par ATM dans ces mêmes conditions en lien avec l'acétylation (figure 4.7). L'acétylation de la protéine Tip60 au sein de son domaine catalytique MYST est essentielle à sa fonction. L'acétylation au sein de son autre domaine fonctionnel de liaison à la chromatine est donc d'intérêt majeur. Ces travaux suggèrent que l'acétylation de K52 impacte l'activité du complexe et potentiellement sa reconnaissance de la méthylation de H3 ou de l'interface ADN-histones. La mutation de ce résidu influence le ciblage du complexe au sein du génome et lors de sa fonction durant la réponse aux dommages de l'ADN. On peut supposer que cette acétylation pourrait alors diriger son activité acétyltransférase vers des substrats non-histones impliqués dans la signalisation et la réparation des dommages. De manière intéressante, l'acétylation constitutive du résidu homologue chez la levure a un impact important sur la survie.

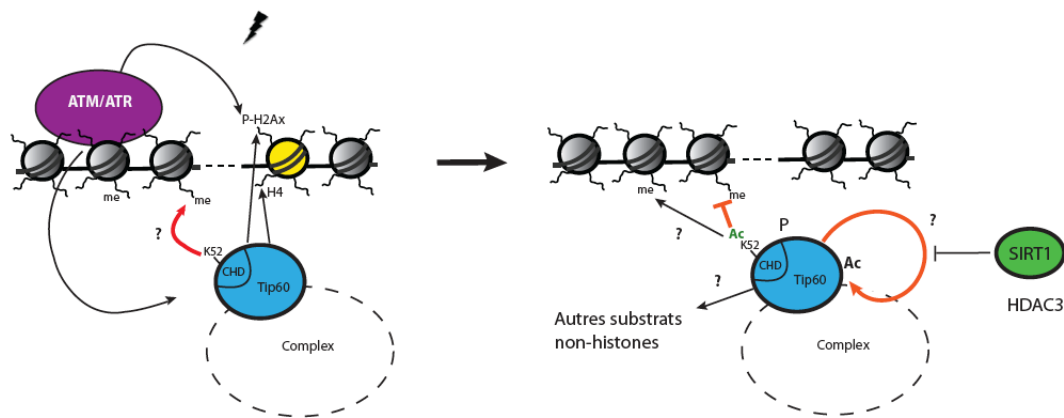


Figure 4.7: Modèle du rôle de l'acétylation de K52 au cours de la réponse aux dommages

Afin d'améliorer l'analyse par spectrométrie de masse, des expériences d'immunoprécipitation anti-acétyl-K pourront être effectuées après digestion par la trypsine afin d'enrichir en peptides d'intérêt comme dans les études initiales (Choudhary et al 2009). Une méthode de ciblage des peptides d'intérêt (NMR) sera utilisée afin d'augmenter les chances de détecter K52 acétylée. Il sera important de confirmer si l'on a affaire à un phénomène d'autoacétylation de K52 (en *cis* ou en *trans*) et de regarder si elle impacte bel et bien l'ubiquitylation ou la sumoylation de Tip60 en lien avec la DDR (Cheng et al., 2008; Legube et al., 2002).

L'effet sur la spécificité de reconnaissance de marque devra être confirmé. La purification des domaines acétylés en bactérie pourra s'avérer pertinente puisqu'une glutamine ne mime pas parfaitement l'acétylation d'une lysine (Neumann et al., 2009). L'utilisation de chromatine dépourvue de la queue N-

terminale d'H3 pourra confirmer que TIP60 cible la chromatine à travers la liaison d'H3 et que le chromodomaine de Tip60 a un impact sur la présentation du substrat. La chromatine de levure issue de souche déplétée pour SET2, la méthyltransférase de H3K36, pourra éliminer l'impact de MRG15, un autre lecteur de H3 au sein du complexe.

Dans le but d'approfondir le rôle de K52ac *in vivo* dans un contexte de transcription, des analyses par puce à ARN seront effectuées dans les lignées K562 après transfection avec un siRNA dirigé contre la protéine endogène. Les résultats pourront être mis en parallèle avec les données de ChIP-seq (figure 4.4). Nous avons à présent un siRNA dirigé contre le 3'UTR validé qui nous permettra d'effectuer toutes les analyses fonctionnelles dans ces lignées. Une stratégie d'édition du génome par méthode CRISPR-Cas9 pourra aussi être envisagée.

En réponse à des dommages de l'ADN, l'activation d'ATM et de ses effecteurs sera analysée par western blot. Là encore, la déplétion de la protéine endogène permettra sans aucun doute d'exacerber le phénotype déjà observé sur la croissance et l'activation des points de contrôle du cycle cellulaire. Une expérience préliminaire semble déjà montrer une différence de phosphorylation de RPA, donc d'activation, dans les cellules qui surexpriment le mutant K52Q en réponse à des dommages (données non montrées). Il sera également approprié de poursuivre les expériences d'immunofluorescence de 53BP1, en réponse à des dommages de l'ADN afin de regarder la dynamique des foyers dans les lignées mutantes (voir chapitre 3). D'autres sites d'acétylation dans le CBD devront être mutés pour écarter une redondance éventuelle (Peng et al., 2012). Finalement, l'interrelation éventuelle entre K52ac et la phosphorylation de Y44 sera testée. L'utilisation d'un anticorps spécifique pour les tyrosines phosphorylées permettra l'analyse par western blot dans les mutants de la lysine K52.

Figure supplémentaire 4.1: Analyse de la phosphorylation du complexe TIP60 par spectrométrie de masse

Purification contrôle (Figure 4.1-A)

EP400:

T320, S321 or S323: TPGVLLPGAGGAAGFGMTSPPPPT*S*PS*R

T743, S749, T752 or S756: T*PGVVAS*APT*KPQS*PAQNATSSQDSSQDTLTEQITLENQVHQR

T945: KASISLT*DDEVDDDEEETIEEEEANEGVVDHQTELSNLAK

S1732: VAVNALAVGEPGTASKPAS*PIGGPTQEEK

S2681: AVGS*PATATPDLVSMATTQGV

ACTB:

S239 and Y240: S*Y*ELPDGQVITIGNER

Purification daunorubicine (Figure 4.1-A)

EP400:

S163, S164 or S165: AGAPGPGLGLCS*S*S*PTGGFVDASVLVR

T320, S321 or S323: TPGVLLPGAGGAAGFGMTSPPPPT*S*PS*R

T761, S762, S763, S766 or S767: TPGVVASAPTKPQSPAQNAT*S*S*QDS*S*QDTLTEQITLENQVHQR

S1732: VAVNALAVGEPGTASKPAS*PIGGPTQEEK

BRD8:

T264: MLGQKAT*PPPSPLSELLK

S487: APS*IDGKEELDIAEK

DMAP1:

S448: DTIIDVVGAPLTPNS*R

ACTB:

S239 and Y240: S*Y*ELPDGQVITIGNER

Purification contrôle HDACi (Figure 4.1-D)

EP400:

S108: SPATGQNVNITLQSVGPVVGNNQITLAPLPLPS*PTSPGFQFSAQPR

S163: AGAPGPGLGLCS*SSPTGGFVDASVLVR

S164: AGAPGPGLGLCSS*SPTGGFVDASVLVR

S722: SS*PVNRPSSATNK

S736: ALS*PVTSR

S1732: VAVNALAVGEPGTASKPAS*PIGGPTQEEK

T2294: HKT*DPSAAGR

T3152: LKT*PTKPPCQ

TRRAP:

S2051: GLS*VDSAQEVKR

S2078: SQS*LPGADSLAKPIDK

BRD8:

T175: QAVKT*PPR

S283: GSLLPTS*PR

RUVBL2:

S340: GTS*YQSPHGIPIDLLDR

EPC1:

S358: VLPSSAAATPQQTS*PAALPVFNAK

DMAP1:

T238: LYNRT*PEQVAEEEEYLLQELR

T410: AGVLGGPAT*PASGPGPASAEPVTEPGLGDPDK

T446: DTIIDVVGAPLT*PNSR

S449: DTIIDVVGAPLTPNS*R

KAT5:

S90: NGLPGSRPGS*PER

BAF53a:

S1: S*GGVYGGDEVGALVFDIGSYTVR

Y6: SGGVY*GGDEVGALVFDIGSYTVR

S233: EAVREGS*PANWK

MRGBP:

S191: VLTANS*NPSSPSAAK

S194: VLTANSNPS*SPSAK

S195: VLTANSNPSS*PSAAKR

Purification etoposide HDACi (Figure 4.1-D)

EP400:

S108: SPATGQNVNITLQSVGPVVGNNQITLAPLPLPS*PTSPGFQFSAQPR

S163: AGAPGPGGLGLCS*SSPTGGFVDASVLVR

S164: AGAPGPGGLGLCSS*SPTGGFVDASVLVR

S736: ALS*PVTSR

S1732: VAVNALAVGEPGTASKPAS*PIGGPTQEEK

TRRAP:

S2051: GLS*VDSAQEVKR

S2078: SQS*LPGADSLAKPIDK

BRD8:

T175: QAVKT*PPR

S283: GSLLPTS*PR

T264: AT*PPPSPLLSELLK

EPC1:

S60: AIS*AQQVYGEKR

T357: VLPSSAAATPQQT*SPAALPVFNAK

S358: VLPSSAAATPQQTS*PAALPVFNAK

DMAP1:

T410: AGVLGGPAT*PASGPGPASAEPVTEPGLGDPDK
T446: DTIIDVVGAPLT*PNSR
S449: DTIIDVVGAPLTPNS*R

RUVBL2:
S340: GTS*YQSPHGIPIDLLDR

BAF53a:
S1: S*GGVYGGDEVGALVFDIGSYTVR
S233: EAVREGS*PANWK

MRGBP:
S194:VTDKVLANSNPS*SPSAK
S195: VLTANSNPSS*PSAAK

Figure supplémentaire 4.2: Analyse de l'acétylation du complexe TIP60 par spectrométrie de masse

Purification contrôle HDACi (Figure 4.1-D)

EP400:

K1553: HQPASASSTAASPAHPAK*LR
K1634: VAQPETPVTLQFQGSK*FTLSHSQLR
K2744: SLVPQVSQATGVQLPGK*TITPAHFQLLR
K3151: LKTPTK*PPCQ

EPC1:

K512: SFSK*DLSQILVNIK
K801: LAAAANCQVSK*VPSSSVDSVPR

BRD8:

K81: K*RGEKGEVVETVEDVIVRK
K85: GEK*GEVVETVEDVIVR
K174: QAVK*TPPR
K457: SGVAEAPVGSK*APSIDGKEELDIAEK

MBTD1:

K70: DAFYSK*TKR
K116: QPLVAK*LAAYAQYQATLQNQAK
K575: ENQSASSK*QK

DMAP1:

K301: EAEK*PAVPETAGIKFPDFK
K450: K*RRESASSSSSVK

ING3:

K96: K*LDQELAK
K181: FKSEALLSTLSDASK*ENTLGCR

KAT5:

K104: EVPASAQASGK*TLPIPVQITLR

RUVBL1:

K22: TQRIASHSHVK*GLGLDESLAK

RUVBL2:

K186: DK*VQAGDVITIDK
K417: K*GTEVQVDDIKR

BAF53a:

K303: LK*IPEGLFDPSNVK

Purification etoposide HDACi (Figure 4.1-D)

EP400:

K1553: HQPASASSTAASPAHPAK*LR

K2744: SLVPQVSQATGVQLPGK*TITPAHFQLLR

K3151: LKTPTK*PPCQ

EPC1:

K801: LAAAANCQVSK*VPSSSVDSVPR

BRD8:

K85: RGEK*GEVVETVEDVIVRK

K174: QAVK*TPPR

MBTD1:

K116: QPLVAK*LAAYAQYQATLQNQAK

K390: EGMK*LEAIDPLNLSTICVATIR

DMAP1:

K301: EAEK*PAVPETAGIKFPDFK

ING3:

K79: ALEDADEK*VQLANQIYDLVDR

K181: FKSEALLSTLTS DASK*ENTLGCR

KAT5:

K104: EVPASAQASGK*TLPIPVQITLR

RUVBL2:

K186: DK*VQAGDVITIDK

K417: K*GTEVQVDDIKR

BAF53a:

K303: LK*IPEGLFDPSNVK

5. Chapitre 5 : Discussion - Conclusion

Le complexe acétyltransférase TIP60/NuA4 est un large complexe multiprotéique formé d'une vingtaine de sous-unités. Il est essentiel au fonctionnement de la cellule notamment pour la régulation de la transcription et la réparation des cassures double-brin de l'ADN. Le but de mon projet de doctorat était de comprendre le fonctionnement du complexe au cours de la réponse aux dommages de l'ADN. Mes objectifs portaient sur l'étude de son recrutement à la cassure, sa fonction spécifique et sa régulation au cours de la réparation des dommages de l'ADN. L'analyse du complexe natif par spectrométrie de masse a permis d'éclaircir l'ensemble de ces points et à conduit notamment à l'identification d'une nouvelle sous-unité possédant un domaine de lecture de la chromatine.

5.1 MBTD1 : une nouvelle sous-unité du complexe TIP60

L'analyse protéomique du complexe TIP60 natif a été permise grâce à la mise en place de 2 méthodes d'édition du génome: l'insertion ciblée d'une copie exogène étiquetée par une nucléase à doigt de zinc et l'étiquetage du gène endogène par la méthode CRISPR-Cas9 (chapitre 2). Ces deux techniques ont pour objectif de conserver le niveau d'expression endogène, ou au plus proche, afin de ne pas perturber l'équilibre du complexe. La première version de l'étiquette comprenait une triple séquence FLAG suivie d'une double séquence HA (AAVS1-V1). L'étiquette 2xHA ne s'est pas avérée fonctionnelle et les premières purifications ont été effectuées par une simple immunoprécipitation anti-FLAG (chapitres 3 et 4). Par la suite, la séquence HA a été remplacée par une double étiquette STREP (AAVS1-V2). Le protocole de purification TAP anti-FLAG suivi d'une étape de purification par l'étiquette STREP a ensuite été utilisé pour les purifications de complexes (chapitre 2). Le développement d'un protocole de purification compatible avec des analyses approfondies par spectrométrie de masse (MS) a permis d'étudier sa composition. Toutefois, cette méthode ne permet d'isoler qu'une partie seulement du complexe qui se situe dans la fraction nucléaire soluble, donc il n'est pas exclu que nous n'ayons qu'une vision partielle des complexes. La purification du complexe issu de la fraction insoluble peut être effectuée après digestion de la chromatine par la benzonase. L'immunoprécipitation du complexe pourra être effectuée suite à cette digestion couplée à une analyse en MS.

Nous avons ainsi pu identifier MBTD1, une nouvelle sous-unité unique au complexe dans le sous-module piccolo-TIP60 (chapitres 2 et 3). MBTD1 est apparenté à la famille Polycomb (PcG) qui regroupe des répresseurs de la transcription. MBTD1 est l'homologue de Sfmbt chez la drosophile, qui possède également 4 domaines MBT spécifiques de H4K20me (Klymenko et al., 2006). Parmi ses paralogues, MBTD1 partage une importante homologie avec L3MBTL2. Cependant ces deux protéines ont des fonctions opposées. En effet, L3MBTL2 est un membre d'un sous-complexe PRC1 (PRC1L4) qui

joue un rôle d'inhibition de la transcription (Trojer et al., 2011). Il participe au ciblage du complexe au TSS des gènes réprimés et induit la mono-ubiquitylation de H2AK119. De plus, L3MBTL2 interagit avec la chromatine indépendamment de sa méthylation.

MBTD1 possède un domaine Znf en N-terminal non caractérisé de type C2C2 qui pourrait lier les acides nucléiques. Il sera intéressant de caractériser ce domaine via des expériences de liaison à l'ADN *in vitro*. Il pourrait notamment lier l'ARN comme c'est le cas pour L3MBTL2 (Lechtenberg et al., 2009). L'expression d'un mutant dépourvu du domaine N-terminal Znf dans les cellules KO MBTD1 permettra également d'étudier le rôle fonctionnel de ce domaine.

Le KO de MBTD1 a été produit chez la souris (Honda et al., 2011). Cependant, le manque de contrôles ne permet pas d'écarter l'expression potentielle d'une protéine tronquée qui contiendrait le domaine à doigt de zinc non caractérisé de MBTD1. Néanmoins, les souris meurent peu après la naissance (stade P14) et présentent des défauts squelettiques importants ainsi qu'une aplasie du foie associée à une perte des cellules souches hématopoïétiques (HSC). Finalement, les auteurs observent un défaut de prolifération et une augmentation de l'apoptose dans les cellules KO. Cependant, les analyses par microarray dans les cellules HSC diffèrent de nos résultats obtenus en cellules U2OS. Nous avons également établi une lignée inactivée par CRISPR/Cas9 pour MBTD1 en cellules K562 (données non montrées). Leur analyse par microarray a révélée que les gènes les plus affectés sont impliqués dans la biosynthèse de la globine. De plus, MBTD1 a aussi été identifiée dans des cribles basés sur des siRNAs en cellules ES à la fois comme un facteur nécessaire à la différenciation des cellules épidermales au même titre que Jmjd2A, mais aussi au maintien des cellules souches hématopoïétiques (Mulder et al., 2012). Ceci suggère un effet spécifique du type cellulaire au cours du développement. Finalement, les anomalies observées chez la souris suggèrent un lien avec l'anomalie Klippel-Feil, elle-même potentiellement reliée à l'Anémie de Fanconi (Houten and Nasser, 2012; McGaughan, 2003).

MBTD1 semble aussi impliquée dans le processus d'oncogenèse. Dans certains cancers du col de l'utérus, la fusion de EPC1 avec PHF1 est un évènement récurrent (Micci et al., 2006) (appendice 1). Cette fusion induit la formation d'un mégacomplexe qui contient les activités enzymatiques de TIP60 et du *Polycomb repressive complex* (PRC2) portée par EZH2 (appendice 2). Ainsi, l'activité acétyltransférase de TIP60 se retrouve ciblée à certains promoteurs de gènes normalement mis sous silence par PRC2. Les activités se retrouvent donc partiellement ciblées de manière inappropriée (Avvakumov et al, en préparation). De plus, la fusion induit aussi la perte du domaine C-terminal d'EPC1 et le décrochage de MBTD1 du complexe. Finalement une fusion d'EPC1 avec ASXL2 relie cette fois TIP60 sans MBTD1

avec le *Polycomb repressive deubiquitinase complex* (PR-DUB) (Nakahata et al., 2009) (Avvakumov et al., en préparation).

La littérature reporte aussi des translocations oncogéniques qui impliquent directement MBTD1. La fusion de MBTD1 avec ZMYND11 a été rapportée dans les leucémies myéloïdes aiguës (AML) chez l'enfant (De Braekeleer et al., 2013; de Rooij et al., 2016). Le point de fusion est situé dans l'exon 3 de MBTD1 avant le domaine ZnF. De son côté, ZMYND11 possède un BRD-PWWP spécifique de H3.3K36me₃, qui se retrouve alors en N-terminal de MBTD1 (Wen et al., 2014). ZMYND11 est à la fois un co-represseur transcriptionnel et un régulateur de l'épissage alternatif (Guo et al., 2014). D'après nos expériences avec EPC1-PHF1, TIP60 pourrait donc être ciblé de façon non appropriée aux cibles de ZMYND11.

Une dernière fusion implique CXorf67 et MBTD1 dans certains cancers du col de l'utérus (Dewaele et al., 2014). La fusion a lieu après le MBT4 de MBTD1, donc selon nos travaux tout le complexe TIP60 se retrouverait lié à cette protéine non caractérisée. La fusion pourrait ainsi bloquer la liaison de MBTD1 à H4K20me ou relier TIP60 à une fonction encore non identifiée de CXorf67.

MBTD1 est une protéine encore peu caractérisée mais qui semble jouer un rôle important dans le complexe TIP60. Il n'existe pas de MBTD1 chez *S.cerevisiae*, de même que H4K20 n'est pas méthylé. Cependant chez *S. pombe*, qui possède H4K20me mais pas MBTD1, il serait intéressant de voir comment NuA4 régule la réparation des CDB et le choix des voies de réparation. Notamment il serait intéressant d'étudier la relation entre NuA4 et Crb2 l'homologue de 53BP1 dans ce contexte particulier.

5.2 La grande diversité de composition du complexe TIP60 et de ses sous-complexes

Il est clair que le complexe TIP60 existe sous différentes "versions" dépendamment des protéines qui le composent. En effet, l'existence de paralogues suggère qu'il existe différents types de complexes spécialisés au sein de la cellule (Washburn, 2016). Ainsi, 19 protéines peuvent faire partie du complexe composé de 17 sous-unités différentes. De plus, certaines protéines sont présentes en copie multiple (RUVBL1/2) pouvant porter le nombre total de sous-unités à 27 potentiellement.

MRG15 et MRGX sont mutuellement exclusifs dans TIP60, il existe donc potentiellement 2 populations de TIP60 qui ne sont pas ciblées aux mêmes régions du génome à travers la liaison de H3K36me₃. De plus, MRG15 et MRGX semblent avoir des fonctions différentielles durant la réparation (Hayakawa et al., 2007). Nous avons pu confirmer que les 2 paralogues ont des fonctions opposées

pendant la réparation des CDBs dans les systèmes rapporteurs pour la NHEJ et la RH, ainsi que sur la survie (données non montrées).

Contre toute attente, EPC1 et EPC2 lient toutes les deux MBTD1 (chapitres 2 et 3). En effet, les 2 paralogues diffèrent uniquement au niveau de quelques résidus de leur domaine C-terminal. La liaison de MBTD1 par l'un des paralogues aurait pu nous éclairer sur leurs fonctions. Néanmoins, ceci démontre qu'EPC1 et EPC2 lient MBTD1 à travers un domaine commun qu'il reste à définir.

L'existence de variants d'épissage est également de grand intérêt. Dans le cas de Tip60 α et β , l'épissage affecte l'interaction avec d'autres partenaires en dehors des sous-unités du complexe (Sheridan et al; Doyon et al 2004). Cependant, l'épissage est d'autant plus important lorsque les domaines de lectures de la chromatine sont concernés. MRG15 possède ainsi 2 isoformes qui varient au niveau du CHD. MRG15L possède une insertion dans le CHD qui la rapproche de son homologue chez la levure EAF3. Ces 2 variants semblent présenter des différences importantes au niveau de leur capacité de liaison à la chromatine (appendice 3). Ces résultats ont également été confirmés par des expériences d'interaction avec des peptides *in vitro* qui suggèrent que MRG15S (ou canonique) a une plus forte affinité pour H3K36me3 par exemple (données non montrées). On s'attend également à un phénotype différentiel des isoformes de BRD8 à 1 ou 2 bromodomains.

Il existe donc des sous-complexes qui rendent difficile l'étude de leurs fonctions et de celles de TIP60, aussi bien au niveau biochimique que cellulaire. On peut supposer que ces types de complexes distincts peuvent avoir une fonction spécifique au cours du développement, dans certains tissus ou en réponse à certains stress.

MBTD1 semble unique au complexe mais nous ne sommes pas en mesure de conclure que 100% du complexe contienne effectivement MBTD1. De plus, il est possible que MBTD1 puisse fonctionner de manière isolée en dehors de TIP60. Bien que la protéine ne soit pas sur-stoéchiométrique dans nos purifications, il serait intéressant de regarder la présence de MBTD1 dans la fraction chromatinienne. En effet, il est possible que MBTD1 joue en fait la même fonction de masque de H4K20me comme son paralogue L3MBTL1 (Malette et al., 2012). D'autre part, il n'est pas impossible que MBTD1 participe, en tant que protéine isolée, au recrutement de TIP60 au cours de la réparation par exemple. Nous avons notamment identifié des modifications posttraductionnelles dans le domaine C-terminal d'EPC1 qui pourraient potentiellement affecter sa liaison à MBTD1 (chapitre 4). L'acétylation de la lysine 801 est particulièrement intéressante puisqu'elle a également été trouvée ubiquitylée *in vivo* (source PhosphoSitePlus). Comme pour H2A, on peut penser que l'ubiquitylation d'EPC1 pourrait bloquer

l'interaction avec MBTD1 grâce à son encombrement stérique alors que son acétylation pourrait la favoriser. Cette hypothèse pourra être aisément testée via des expériences d'interaction *in vitro*.

Finalement, l'étude de la dynamique de TIP60 en terme de composition conduira à une meilleure compréhension du rôle du complexe. Comme pour d'autres complexes MYST, il est possible que la dynamique des sous-unités soit importante à la régulation de ses activités enzymatiques (Lalonde et al., 2013). De plus, il n'est pas exclu que des modules du complexe aient des fonctions propres, comme MRG15-MRGBP indépendant du complexe TIP60 (Kirkwood et al., 2013). Cependant l'existence d'un sous-complexe EP400 indépendant de Tip60/KAT5 semble remise en question par nos résultats (chapitre 2). Le complexe TIP60 présente donc une grande diversité de composition, potentiellement nécessaire à sa régulation et à ses différentes fonctions mais qui rend son étude particulièrement difficile.

5.3 Recrutement du complexe pendant la réparation

Le ciblage de TIP60 à la chromatine est la somme d'une combinaison de lecteurs de marques épigénétiques. C'est le cas notamment à la cassure double-brin où TIP60 est donc partiellement ciblé à travers MBTD1 et H4K20me1/2. La liaison de MBTD1 à la chromatine semble avoir lieu via le MBT4. La délétion du MBT4 abolit en effet la liaison du domaine au peptide H4 *in vitro* (appendice 4). Néanmoins, l'utilisation du triple mutant du MBT4 (ou mutant 3A; voir chapitre 3) pourra confirmer cette hypothèse de manière plus adéquate étant donné la structure des domaines. L'effet de H4K16ac sur la liaison des MBT est aussi surprenant et semble plus marqué que dans le cas de 53BP1 (appendice 4; (Tang et al., 2013)). L'acétylation de H4K16ac par TIP60 pourrait donc moduler la liaison de MBTD1 à la chromatine au cours de la réparation. Une analyse plus étendue de la spécificité de liaison des MBT pourrait s'avérer intéressante. Il sera important d'explorer la spécificité des domaines MBTs envers d'autres marques de méthylation de la chromatine comme H3K79me, mais aussi des protéines non histones. En effet, L3MBTL1 et 53BP1 sont capables d'interagir avec p53 mono-méthylée sur la lysine 382 au cours de la DDR (Kachirskaia et al., 2008; West et al., 2010).

Nous avons pu observer que H2K15ac semble enrichi par CHIP aux loci préférentiellement réparés par HR et ce avant même l'induction de dommages dans le système DlvA-AID (*DSB inducible via AsiSI-ER and auxin inducible degron*; chapitre 3). La nucléase AsiSI peut être faiblement transloquée au noyau de manière non spécifique en absence de 4-OHT. Afin d'éviter un biais technique, nous avons choisi de cultiver les cellules avec l'auxine pour maintenir l'activation du dégron. Néanmoins, nous n'avons pas pu contrôler qu'il n'y avait pas de cassures "non-désirées" qui auraient pu altérer la structure de la chromatine préalablement à l'expérience. Toutefois, le même effet a été observé à toutes les

cassures que nous avons analysées par ChIP et nous sommes confiant de nos conclusions. Pour écarter totalement cette hypothèse, des analyses par ChIP-seq permettraient de faire une corrélation entre H2AK15ac et les sites pro-HR ainsi qu'avec le niveau de transcription.

Une autre hypothèse serait un lien avec la transcription et notamment entre H3K36me3 et H2K15ac. Ceci pourrait suggérer un rôle de MRG15 au sein du complexe TIP60 pour l'acétylation de H2AK15 sur les gènes transcrits. Les expériences de ChIP-seq pourront confirmer une corrélation de ces 2 marques à l'échelle du génome entier sur des cellules sauvages. D'un côté biochimique, il sera possible de tester l'impact de H3K36me3 sur l'acétylation de H2AK15ac *in vitro* par TIP60 via l'utilisation de substrats chimiquement méthylés (de type MLA) dans des essais HAT. Ce lien n'est pas vraiment en faveur du modèle suggérant le recrutement de Tip60 via H3K9me3 dans l'hétérochromatine mais bien en accord avec le rôle de SET2/H3K36me3 durant la réparation des CDBs par RH (Aymard et al., 2014; Fnu et al., 2011; Pfister et al., 2014).

Finalement, il a été proposé que MRG15, et potentiellement MRGX, interagiraient avec H2B ubiquitylé sur K120 via leur domaine MRG (Wu et al., 2011). L'ubiquitylation de H2B par ChFr et RNF8 stimulerait l'acétylation de H4K16 et l'activation d'ATM. Il serait intéressant de regarder si H2AK15ub peut être reconnu par le domaine MRG et participer au recrutement des complexes à la cassure. Afin de répondre à cette question, des expériences d'interaction *in vitro* peuvent être envisagées avec le domaine MRG purifié et des mononucléosomes ubiquitylés également *in vitro* par RNF168. Comme contrôle de spécificité, d'autres ubiquityl-ligases de H2A et H2B pourront être utilisées. Selon notre modèle, TIP60 active la RH et inhibe la NHEJ. De plus, H2AK15ub inhibe EPC1 et l'acétylation de la chromatine. Cependant, on pourrait assister à une modulation de la réponse aux dommages par TIP60 via le ciblage d'autres substrats. Par exemple, chez la levure, Nej1 l'homologue de XLF, semble acétylé par NuA4 *in vitro* suggérant un rôle inhibiteur de TIP60 dans la voie de NHEJ, plus tard ou à plusieurs niveaux.

Il est important de considérer que le recrutement est différent de la stabilisation du complexe à la cassure. La stabilisation du complexe TIP60 par MRN à la cassure double-brin semble impliquer TRRAP et RAD50 *in vivo* (Robert et al., 2006). Nous avons effectué des expériences d'interaction *in vitro*, à partir de complexe MRN purifié en baculovirus et de complexe TIP60 natif, qui n'ont pas permis de confirmer cette interaction. Cependant nous avons pu observer que NBS1 serait acétylée *in vitro* par TIP60 au niveau de son domaine N-terminal. La stabilisation par MRN pourrait impliquer d'autres facteurs et nécessiter l'activité HAT de TIP60.

D'autre part, PALB2 interagit avec les protéines MRG15 et MRGX. Ceci pourrait aider à recruter TIP60 durant l'invasion de brin. En effet lors de cette étape, il y a eu éviction des nucléosomes et

potentiellement départ de MRN (Polo and Jackson, 2011). Le complexe pourrait être stabilisé à cette étape tardive de la réparation à travers d'autres interactions protéiques afin de permettre son maintien. De la même façon, ce mécanisme peut aussi impliquer le complexe de déacétylation Sin3B à travers MRG15/X. Finalement, l'association de TIP60 à la cassure semble découler d'une combinaison de marques à travers un ensemble de lecteurs et des interactions protéiques encore mal connues, mais conduisant à une fine régulation du complexe.

5.4 Régulation du complexe via des modifications post-traductionnelles

La purification du complexe a aussi permis des analyses approfondies par spectrométrie de masse pour étudier ses différentes modifications posttraductionnelles. Le complexe est le substrat de nombreuses PTM au cours de la DDR qui comprennent notamment l'acétylation, la phosphorylation, la sumoylation et l'ubiquitylation. Nous avons choisi de centrer notre étude sur la phosphorylation et l'acétylation du complexe. Nous avons pu observer la phosphorylation de nombreuses sous-unités du complexe par les kinases de la DDR ATR et ATM (chapitre 4). Cette phosphorylation pourrait être impliquée dans la régulation de l'interaction avec des partenaires. D'autre part, certaines phosphorylations semblent impactées quand la déacétylation est bloquée. Il sera intéressant d'étudier l'interrelation de ces différentes PTM via la production de mutants ponctuels et leur utilisation dans des essais fonctionnels.

L'acétylation de Tip60 pourrait impacter d'autres modifications subséquentes comme la phosphorylation, la sumoylation ou l'ubiquitylation de Tip60 (chapitre 4). Nous avons vu que l'auto-acétylation du complexe joue notamment un rôle sur son activité HAT (appendice 8). La déacétylation après dommage a été confirmée sur Tip60 par un autre groupe (Peng et al., 2012) (chapitre 4). De plus, nous observons le même effet de déacétylation sur l'ensemble du complexe. Ce mécanisme pourrait être général aux HAT, étant donné que MOF aussi subit la même dynamique d'acétylation / déacétylation. Il sera intéressant de purifier ce complexe dans les mêmes conditions afin de confirmer cette hypothèse d'autant plus que MOF est un complexe impliqué dans la réparation via la formation des foyers γ H2AX (Sharma et al., 2010).

La protéine Tip60 est acétylée au sein du CHD potentiellement via un mécanisme d'autoacétylation. Nous proposons un modèle selon lequel cette PTM au sein du domaine de lecture pourrait modifier sa spécificité de liaison (chapitre 4). Intrinsèquement, les CHD ou CBD d'Esa1 et Tip60 présentent des différences structurales. L'alignement de séquence montre l'absence d'un résidu aromatique chez Esa1 qui permettrait de former la cage hydrophobe. En d'autres termes, l'absence de liaison à la méthylation est attendue de par la structure, suggérant que le CBD pourrait interagir avec la

chromatine non modifiée. Les travaux de Song Tan montrent également que le domaine pourrait lier la chromatine à l'interface ADN-histone (Huang and Tan, 2013; Selleck et al., 2005). Dans le cas de Tip60, la structure bien qu'adéquate pour la prise en charge de la méthylation, permettrait également une interaction avec les acides nucléiques (Chen et al., 2015). Cette particularité peut être potentiellement reliée aux différences de la chromatine entre la levure et l'humain.

Néanmoins la lysine K52 acétylée dans le CBD de Tip60 est conservée chez Esa1. Nos nombreuses analyses par spectrométrie de masse (non présentées ici) n'ont pas permis de la détecter, suggérant que cette PTM est minoritaire et/ou que notre protocole de purification ne nous permet pas de purifier Tip60 acétylée sur ce résidu. Il est en effet possible que cette modification soit affectée par le cycle cellulaire ou le compartiment cellulaire. Pour contourner ces éventuels problèmes, des expériences de purifications après synchronisation, traitement aux inhibiteurs de HDAC et fractionnement seront effectuées. Toutefois, la validation de l'anticorps anti-Tip60-K52ac est également un point essentiel sur lequel notre travail va porter. Cet anticorps serait un outil précieux pour la caractérisation de la marque *in vivo* et l'étude de sa régulation. Finalement, le lien entre la phosphorylation de Y44 et l'acétylation de K52 devra être abordé. Premièrement, la phosphorylation sur Y44 est improbable considérant la structure du domaine et du ciblage potentiel de la marque par l'enzyme C-Abl. La tyrosine 44 se situe dans une boucle non accessible enfouie dans le domaine CHD. De plus, il est possible qu'une modification du CHD ait un impact structural sur le domaine MYST, et ce quelle que soit la modification. Cependant, nous n'avons pas observé de changement d'activité du complexe natif après traitement par la daunorubicine ou l'etoposide donc après phosphorylation, quel que soit le substrat et ce même lorsque de la chromatine de cellules endommagées (i.e enrichie en γ H2AX) était utilisée (données non montrées). Les résultats phénotypiques obtenus reflètent une perte de fonctionnalité que nous attendons également avec K52ac. La pertinence de cette modification est d'autant plus remise en question que sa régulation semble improbable: pourquoi C-Abl? quelle est la phosphatase ?

MBTD1 est aussi acétylée *in vivo* selon nos analyses mais aussi selon les expériences de MS dans les cellules KO SIRT1 (chapitre 4; (Peng, 2012 #816) voir matériel supplémentaire). Certains résidus se situent dans les domaines fonctionnels (Znf et MBT), il sera donc intéressant d'étudier leur impact sur la fonction de MBTD1 au sein du complexe. Ceci corrèle avec l'autoacétylation des sous-unités des complexes KAT comme TIP60. On peut aussi se demander si MBTD1 est aussi ubiquitylée comme L3MBTL1 ou VCP, et dégradée par le protéasome. MBTD1 pourrait faire partie d'un mécanisme général de compétition impliquant 53BP1 et le masquage de H4K20me (Acs et al., 2011; Mallette et al., 2012).

5.5 Fonction du complexe durant la réparation des CDB

Nous proposons ici un modèle de la régulation de 53BP1, qui implique H2A et H4 à travers des interactions et des modifications incompatibles de la chromatine. Nous avons en effet identifié un nouveau substrat de TIP60 au sein de la chromatine: H2AK15ac et une compétition entre son ubiquitylation et son acétylation. De manière intéressante, l'acétylation de H2AK15 se comporte très différemment des autres résidus acétylés au sein de la chromatine en réponse à des dommages.

Alors que l'ubiquitylation de H2A inhibe TIP60 en bloquant l'interaction par EPC1, nos résultats suggèrent aussi une fonction de TIP60 dans la régulation de RNF168. En réponse à des dommages, le signal H2AK15ac augmente de façon diffuse dans le noyau et ne colocalise pas de façon évidente avec γ H2AX par immunofluorescence. Nous avons ainsi proposé un rôle de H2AK15ac dans la limitation de l'ubiquitylation de la chromatine par RNF168 en réponse aux dommages. TRIP12 et UBR5 sont nécessaires pour limiter l'activité de RNF168 et la diffusion de H2AK15ub (Gudjonsson et al., 2012). De plus, l'analyse des gènes sous-exprimés dans les cellules U2OS KO MBTD1 montre une corrélation avec la déplétion de UBR5 (chapitre 3; données non montrés, $p=2,3.10^{-10}$). On peut donc se demander s'il existe une relation entre TIP60 et d'autres inhibiteurs de l'ubiquitylation par RNF168, comme OTUB1 (Nakada et al., 2010).

Pour confirmer le mécanisme de compétition, des expériences de CHIP à la cassure pourront être effectuées: 1) des CHIP anti-H2AK15ac dans des cellules transfectées avec un siRNA dirigé contre RNF168 et 2) à l'inverse des CHIP anti-H2AK15ub avec l'anticorps produit par le laboratoire Durocher dans un siRNA Tip60 (Fradet-Turcotte et al en préparation). Le signal H2AK15ac se situe relativement proche de la cassure, et on peut s'attendre à ce que le signal H2AK15ubi s'étende de chaque côté de la CDB dans les cellules transfectées avec un siTip60. D'autre part, si l'anticorps fonctionne en immunofluorescence, comment se comportent les foyers H2AK15ub? sont-ils plus gros et/ou plus nombreux? Les expériences de CHIPseq dans les cellules DivA permettront aussi de confirmer qu'il existe une corrélation de l'acétylation et de l'ubiquitylation de H2AK15 avec RAD51 (RH) et XRCC4 (NHEJ) respectivement.

Nos analyses par spectrométrie de masse ont détecté l'acétylation de H2AK15 mais aussi de H2AK13 à partir d'histones endogènes de MEF (données non montrées; en collaboration avec le laboratoire d'Alain Verreault). On peut supposer que la lysine 13 est aussi un substrat de TIP60, et nous disposons à présent d'un outil pour y répondre grâce à un anticorps commercial récemment disponible. Également, il est possible que d'autres acétyltransférases catalysent l'acétylation de H2AK15 et possiblement K13. La meilleure candidate est p300/CBP qui cible H2A sur la lysine 5. Les CHIP anti-

H2AK15ac dans les DIVA après inhibition de TIP60 permettront écarter la possible implication d'une autre HAT *in vivo*.

Nous avons identifié de potentiels nouveaux substrats de TIP60 durant la réparation des CDB de l'ADN. En effet, PALB2 et BRCA2 sont acétylées *in vitro* par le complexe TIP60 (appendice 5). Dans un premier temps, nous avons établi plusieurs lignées dans le système d'édition du génome par ZFN (AAVS1) en K562 et avons purifié PALB2 par double affinité. Nous avons pu confirmer que PALB2 est bien acétylée *in vivo* sans être capable de valider les résidus identifiés *in vitro* par spectrométrie de masse. De plus, un lien direct avec TIP60 n'a pas encore été démontré expérimentalement, même si l'interaction de PALB2 avec MRG15 procure un lien fonctionnel évident. De manière intéressante, les résidus identifiés comme acétylés se situent sur les domaines d'interaction de PALB2 avec RAD51, BRCA1 et l'ADN. De plus, l'analyse de PALB2 acétylée *in vitro* par TIP60 a identifié la lysine 25, qui est ubiquitylée par KEAP1-CUL3-RBX1 *in vivo* (appendice 5; (Orthwein et al., 2015)). L'ubiquitylation de PALB2 bloque le recrutement de BRCA1, qui lui-même permet l'activation de la résection par CtIP. Cette ubiquitylation de PALB2 est ainsi spécifique de la phase G1 du cycle cellulaire (Orthwein et al., 2015). Ceci pourrait expliquer nos difficultés à détecter PALB2 acétylée dans nos purifications, qui ont été effectuées sur des cellules asynchrones (donc majoritairement en G1). À la lumière de ces nouveaux résultats, il sera donc pertinent d'effectuer des purifications de PALB2 à partir de cellules en G2, dans le cas où l'acétylation serait logiquement pro-HR. D'autre part, l'acétylation de K25 pourrait favoriser l'interaction avec BRCA1 et une compétition entre ubiquitylation et acétylation pourrait réguler les interactions de PALB2 avec ses partenaires. L'impact de l'acétylation et de l'ubiquitylation sur la multimérisation de PALB2 pourra aussi être étudié. De plus, MRG15 serait capable de lier la chromatine ubiquitylée via son MRG (Wu et al., 2011). On peut alors envisager que le domaine pourrait interagir également avec PALB2 ubiquitylée. Cette hypothèse pourra être testée via des expériences d'interaction *in vitro*. De plus, nous avons identifié un site d'acétylation de MRG15 en complexe avec PALB2 au sein du domaine MRG qui pourrait moduler leur interaction (appendice 5; données non montrées d'acétylation *in vitro* de PALB2-MRG15 par TIP60)

Concernant BRCA2, l'acétylation se situe sur son domaine C-terminal à proximité de son NLS et du résidu phosphorylé par CDK (Esashi et al., 2005) (appendice 5). Cependant, nous n'avons pas été en mesure d'identifier des résidus par MS ou de confirmer son acétylation *in vivo*. Néanmoins, le fait que TIP60 puisse acétyler ces protéines, qui sont plus en aval dans la voie, semble suggérer que TIP60 jouerait une fonction plus tardive durant la réparation. Il est possible que TIP60 soit aussi un régulateur de la résolution des jonctions de Holliday à travers ses hélicases RUVBL1/2. En effet, RuvB est

responsable des mouvements des jonctions de Holliday durant la recombinaison chez la bactérie. Notamment, il est possible que TIP60 soit impliqué dans le remodelage de la chromatine sur le brin matrice à cette étape.

Nous envisageons également d'autres moyens de régulation de 53BP1 par TIP60. En effet, 53BP1 est acétylée *in vivo* sur plusieurs résidus au sein de son domaine FFR (1220-1711) responsable de l'accumulation en foyers de réparation (PhosphoSitePlus). L'un des résidus (K1626) se situe notamment au niveau de son domaine UDR (1604-1631) et à proximité du résidu phosphorylé par Aurora B en mitose (T1609). Cependant, des résultats préliminaires suggèrent que le domaine UDR n'est pas un substrat de TIP60 *in vitro*. Des expériences *in vivo* avec des mutants ponctuels mimant l'acétylation constitutive pourront être réalisées afin de savoir si ces modifications peuvent effectivement moduler l'accumulation de 53BP1 aux sites de dommages par immunofluorescence. L'implication de TIP60 ou d'autres KAT comme MOF devra être éclaircie.

Finalement, nous avons identifié DMAP1 comme une déméthylase de H4K20me au sein du complexe TIP60 (Bhat et al en préparation). De manière intéressante, DMAP1 cible H4K20me alors que son homologue EAF2 chez la levure cible H3K79me. L'activité de DMAP1 renforcerait ainsi le modèle d'inhibition de 53BP1 par TIP60 en provoquant la déméthylation de H4K20me^{2/3} vers la mono-méthylation pour favoriser la liaison de MBTD1 à la cassure par rapport à 53BP1. Notre modèle général va ainsi à l'encontre de la méthylation *de novo* de H4K20 à la cassure. Il y aurait donc une relation étroite conservée au cours de l'évolution entre NuA4 et RAD9 vs TIP60 et 53BP1 à travers la méthylation de la chromatine. Des expériences complémentaires seront nécessaires afin d'affiner le modèle d'inhibition de 53BP1 par TIP60, à travers la liaison de la chromatine, au cours de la réparation des CDB et du choix de voie de réparation (figure 5.1).

5.6 Autres fonctions de TIP60

Il est admis que H2AZ est acétylée par NuA4 au sein de la chromatine (Babiarz et al., 2006; Durant and Pugh, 2007; Keogh et al., 2006b). De plus, son acétylation provoquerait son éviction au niveau du TSS des gènes (Zhang et al., 2005). De manière surprenante, nous avons été capables de co-purifier le complexe TIP60 natif avec H2AZ acétylée sur 3 résidus: K5, K8 et K12 (appendice 6). Ceci suggère donc que TIP60 pourrait incorporer H2AZ déjà acétylée dans la chromatine ou de catalyser son éviction de la chromatine. Les travaux antérieurs du laboratoire suggèrent que l'acétylation de H2A par NuA4 active l'incorporation de H2AZ par SWR1 (Altaf et al., 2010). TIP60 étant une fusion de ces 2 complexes, et

étant responsable de l'incorporation de H2AZ, on peut donc supposer un lien entre TIP60 et l'activation de la transcription, indépendamment de la réparation, qu'il sera important d'étudier (Auger et al., 2008; Gevry et al., 2009; Taty-Taty et al., 2014) (appendice 9). YL1 est un chaperon de H2AZ présent dans TIP60 et SRCAP (Latrick et al., 2016). Il sera intéressant de tester l'interaction de H2AZ acétylée avec YL1. Des expériences d'échange d'histones *in vitro* avec H2AZ acétylée comme substrat permettront de déterminer si l'acétylation de H2AZ influence son insertion dans la chromatine par TIP60 ou son éviction.

Les données présentées en chapitres 2 et 3 remettent également en cause certains travaux de la littérature qui proposent que le chaperon de H2AZ ANP32E serait une sous-unité de TIP60 (Obri et al., 2014). ANP32E n'a jamais été détectée dans nos diverses purifications et d'autres travaux supportent nos observations (Latrick et al., 2016; Mao et al., 2014). Ces résultats peuvent être expliqués par une copurification de chromatine avec la protéine d'intérêt. Il est en effet probable que ces différents facteurs se situent à proximité au sein du génome lors du passage de la polymérase.

MBTD1 est le chaînon manquant entre H4K20me et l'activation de la transcription. Le fait que H4K20me1 soit détectée par ChIP-seq sur le corps de gènes activement transcrits et sa colocalisation avec l'acétylation de la chromatine semblent impliquer TIP60 (Ernst et al., 2011; Pesavento et al., 2008a). De plus, l'activité de DMAP1 renforce ce lien fonctionnel. De manière intéressante, en réponse à des dommages de l'ADN, le ciblage du complexe TIP60 via MBTD1 aux promoteurs de gènes est fortement diminué (appendice 7). Les cibles du complexe, définies par la colocalisation de 3 sous-unités uniques, sont alors partiellement conservées. Le complexe semble relocalisé en partie indépendamment de la présence de MBTD1 dans le complexe. L'induction de dommages par irradiation ayant un effet global sur la chromatine, il sera nécessaire de confirmer que MBTD1 ne joue pas de rôle dans le ciblage aux promoteurs de gènes dans ces conditions via des expériences de ChIP classiques

La lysine 15 de l'histone H2A est un nouveau substrat de TIP60 régulé au cours du cycle cellulaire. En effet, H2AK15ac semble augmenter au cours de la phase S jusqu'en phase G2. Elle est potentiellement enrichie sur la chromatine transcrite et semble permissive pour la RH. On pourrait supposer d'autres fonctions de H2AK15ac durant la réplication ou la transcription. Par exemple, un lien possible avec la réplication de l'ADN, et notamment avec l'inhibition de la re-réplication liée à la méthylation de H4K20 peut être envisagé ainsi que la réparation des CDB pendant la phase S issus de l'effondrement de la fourche. Il sera important d'approfondir les expériences de synchronisation et d'étudier la colocalisation de H2AK15ac avec H3K56ac, ou après marquage au BrdU, sur les histones

nouvellement incorporées. D'autre part, la collision des machineries de transcription et de réparation pourrait impliquer l'orchestration de TIP60 et l'induction de H2AK15ac.

5.7 Conclusion:

Le complexe acétyltransférase TIP60 est une plateforme multiprotéique composé de 19 sous-unités. Il renfermerait à lui seul 4 activités enzymatiques et au moins 8 domaines de lecture de marques épigénétiques qui lui permettent d'intégrer des signaux variés en provenance de la chromatine. Il possède plusieurs enzymes capables de catalyser des modifications posttraductionnelles des histones, une activité de remodelage ATP-dépendante et de chaperon d'histone. C'est un acteur clé de la fonction cellulaire impliqué dans la transcription et la stabilité du génome. Au cours de mes travaux de doctorat, nous avons pu identifier une nouvelle sous-unité du complexe qui a permis de mettre en lumière la fonction de TIP60 dans la réparation des cassures double-brin de l'ADN.

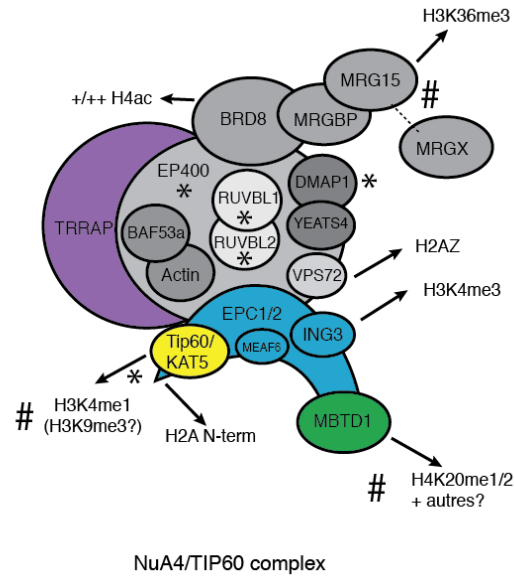
La découverte de MBTD1 au sein du complexe a éclairci la problématique liée au recrutement de TIP60 aux sites de dommages et à sa fonction de régulateur de la DDR. Lors de l'induction de dommage, TIP60 va être recruté au site de cassure à travers MBTD1 et sa liaison à la chromatine. Il sera potentiellement stabilisé à la cassure par MRN et sera impliqué dans le choix de la voie de réparation en amont de 53BP1. Ce rôle décisionnel se fera à travers l'acétylation de la chromatine et la compétition pour H4K20me. De plus, une fonction plus tardive de TIP60 est suggérée par l'identification de nouveaux substrats non histone au sein de la voie de RH. Finalement, TIP60 est régulé à travers de nombreuses modifications posttraductionnelles comprenant l'acétylation et la phosphorylation. L'autoacétylation des domaines fonctionnels de Tip60 est d'intérêt majeur, notamment en lien avec la réponse aux dommages de l'ADN. Les autres modifications identifiées devront être caractérisées quant à leur fonction dans la régulation du complexe. De plus, nous avons confirmé son lien dans l'oncogenèse via l'étude de translocations retrouvées dans certains cancers et en lien avec des dérégulations transcriptionnelles majeures.

Finalement, la pertinence de ces travaux repose sur l'étude de TIP60 en tant que complexe. Sa structure en fait un chef d'orchestre unique capable de réguler la chromatine à tous les niveaux. C'est également une plateforme malléable qui va intégrer des signaux variés en provenance de la chromatine et va être lui-même régulé par des PTMs. Toutes ces caractéristiques lui permettent une réponse finement régulée dans le temps et l'espace. Ses différentes activités enzymatiques ne sont significatives qu'au sein de cette entité multiprotéique: le complexe fonctionne comme un ensemble et ses différentes sous-unités ont une fonction régulatrice à travers leur interaction avec des partenaires ou des substrats.

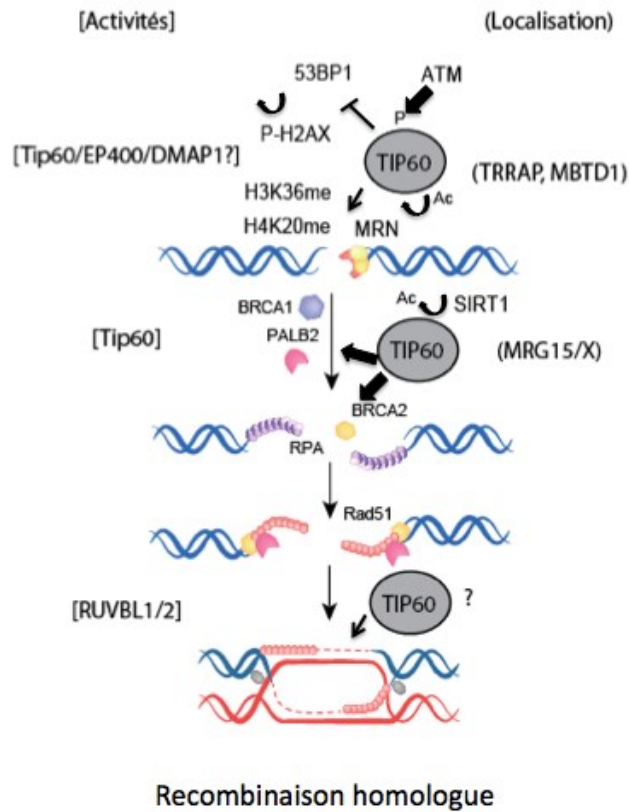
Figure 5.1: Rôle du complexe TIP60 au cours de la réparation des CDBs par recombinaison homologue.

A- Composition, spécificité du complexe. * : activités enzymatiques; # : liaison potentielle à l'ADN. B- Fonctions du complexe pendant la RH.

A



B



Références

- Abmayr, S.M., Yao, T., Parmely, T., and Workman, J.L. (2006). Preparation of nuclear and cytoplasmic extracts from mammalian cells. *Curr Protoc Mol Biol Chapter 12*, Unit 12 11.
- Acs, K., Luijsterburg, M.S., Ackermann, L., Salomons, F.A., Hoppe, T., and Dantuma, N.P. (2011). The AAA-ATPase VCP/p97 promotes 53BP1 recruitment by removing L3MBTL1 from DNA double-strand breaks. *Nat Struct Mol Biol* 18, 1345-1350.
- Adam, S., Polo, S.E., and Almouzni, G. (2013). Transcription recovery after DNA damage requires chromatin priming by the H3.3 histone chaperone HIRA. *Cell* 155, 94-106.
- Ahmad, K., and Henikoff, S. (2002). The histone variant H3.3 marks active chromatin by replication-independent nucleosome assembly. *Mol Cell* 9, 1191-1200.
- Akhtar, A., and Becker, P.B. (2000). Activation of transcription through histone H4 acetylation by MOF, an acetyltransferase essential for dosage compensation in *Drosophila*. *Mol Cell* 5, 367-375.
- Akhtar, A., Zink, D., and Becker, P.B. (2000). Chromodomains are protein-RNA interaction modules. *Nature* 407, 405-409.
- Alabert, C., Barth, T.K., Reveron-Gomez, N., Sidoli, S., Schmidt, A., Jensen, O.N., Imhof, A., and Groth, A. (2015). Two distinct modes for propagation of histone PTMs across the cell cycle. *Genes Dev* 29, 585-590.
- Alberts, B. (1998). The cell as a collection of protein machines: preparing the next generation of molecular biologists. *Cell* 92, 291-294.
- Alekseyenko, A.A., Gorchakov, A.A., Kharchenko, P.V., and Kuroda, M.I. (2014). Reciprocal interactions of human C10orf12 and C17orf96 with PRC2 revealed by BioTAP-XL cross-linking and affinity purification. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111, 2488-2493.
- Ali, A.M., Pradhan, A., Singh, T.R., Du, C., Li, J., Wahengbam, K., Grassman, E., Auerbach, A.D., Pang, Q., and Meetei, A.R. (2012). FAAP20: a novel ubiquitin-binding FA nuclear core-complex protein required for functional integrity of the FA-BRCA DNA repair pathway. *Blood* 119, 3285-3294.
- Allard, S., Utley, R.T., Savard, J., Clarke, A., Grant, P., Brandl, C.J., Pillus, L., Workman, J.L., and Cote, J. (1999). NuA4, an essential transcription adaptor/histone H4 acetyltransferase complex containing Esa1p and the ATM-related cofactor Tra1p. *EMBO J* 18, 5108-5119.
- Altaf, M., Auger, A., Monnet-Saksouk, J., Brodeur, J., Piquet, S., Cramet, M., Bouchard, N., Lacoste, N., Utley, R.T., Gaudreau, L., *et al.* (2010). NuA4-dependent acetylation of nucleosomal histones H4 and H2A directly stimulates incorporation of H2A.Z by the SWR1 complex. *J Biol Chem* 285, 15966-15977.
- Altaf, M., Utley, R.T., Lacoste, N., Tan, S., Briggs, S.D., and Cote, J. (2007). Interplay of chromatin modifiers on a short basic patch of histone H4 tail defines the boundary of telomeric heterochromatin. *Mol Cell* 28, 1002-1014.
- Altmeyer, M., Messner, S., Hassa, P.O., Fey, M., and Hottiger, M.O. (2009). Molecular mechanism of poly(ADP-ribosylation) by PARP1 and identification of lysine residues as ADP-ribose acceptor sites. *Nucleic Acids Res* 37, 3723-3738.
- Angelov, D., Molla, A., Perche, P.Y., Hans, F., Cote, J., Khochbin, S., Bouvet, P., and Dimitrov, S. (2003). The histone variant macroH2A interferes with transcription factor binding and SWI/SNF nucleosome remodeling. *Mol Cell* 11, 1033-1041.
- Arnold, K.M., Lee, S., and Denu, J.M. (2011). Processing mechanism and substrate selectivity of the core NuA4 histone acetyltransferase complex. *Biochemistry* 50, 727-737.
- Auger, A., Galarnau, L., Altaf, M., Nourani, A., Doyon, Y., Utley, R.T., Cronier, D., Allard, S., and Cote, J. (2008). Eaf1 is the platform for NuA4 molecular assembly that evolutionarily links chromatin acetylation to ATP-dependent exchange of histone H2A variants. *Mol Cell Biol* 28, 2257-2270.
- Avvakumov, N., and Cote, J. (2007). The MYST family of histone acetyltransferases and their intimate links to cancer. *Oncogene* 26, 5395-5407.
- Avvakumov, N., Lalonde, M.E., Saksouk, N., Paquet, E., Glass, K.C., Landry, A.J., Doyon, Y., Cayrou, C., Robitaille, G.A., Richard, D.E., *et al.* (2012). Conserved molecular interactions within the HBO1 acetyltransferase complexes regulate cell proliferation. *Mol Cell Biol* 32, 689-703.

Aymard, F., Bugler, B., Schmidt, C.K., Guillou, E., Caron, P., Briois, S., Iacovoni, J.S., Daburon, V., Miller, K.M., Jackson, S.P., *et al.* (2014). Transcriptionally active chromatin recruits homologous recombination at DNA double-strand breaks. *Nat Struct Mol Biol* 21, 366-374.

Ayoub, N., Jeyasekharan, A.D., Bernal, J.A., and Venkitaraman, A.R. (2008). HP1-beta mobilization promotes chromatin changes that initiate the DNA damage response. *Nature* 453, 682-686.

Ayrappetov, M.K., Gursoy-Yuzugullu, O., Xu, C., Xu, Y., and Price, B.D. (2014). DNA double-strand breaks promote methylation of histone H3 on lysine 9 and transient formation of repressive chromatin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111, 9169-9174.

Babiarz, J.E., Halley, J.E., and Rine, J. (2006). Telomeric heterochromatin boundaries require NuA4-dependent acetylation of histone variant H2A.Z in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev* 20, 700-710.

Baek, S.H., Ohgi, K.A., Rose, D.W., Koo, E.H., Glass, C.K., and Rosenfeld, M.G. (2002). Exchange of N-CoR corepressor and Tip60 coactivator complexes links gene expression by NF-kappaB and beta-amyloid precursor protein. *Cell* 110, 55-67.

Bakkenist, C.J., and Kastan, M.B. (2003). DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation. *Nature* 421, 499-506.

Banaszynski, L.A., Wen, D., Dewell, S., Whitcomb, S.J., Lin, M., Diaz, N., Elsasser, S.J., Chappier, A., Goldberg, A.D., Canaani, E., *et al.* (2013). Hira-dependent histone H3.3 deposition facilitates PRC2 recruitment at developmental loci in ES cells. *Cell* 155, 107-120.

Barber, C.M., Turner, F.B., Wang, Y., Hagstrom, K., Taverna, S.D., Mollah, S., Ueberheide, B., Meyer, B.J., Hunt, D.F., Cheung, P., *et al.* (2004). The enhancement of histone H4 and H2A serine 1 phosphorylation during mitosis and S-phase is evolutionarily conserved. *Chromosoma* 112, 360-371.

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.

Bassett, E.A., DeNizio, J., Barnhart-Dailey, M.C., Panchenko, T., Sekulic, N., Rogers, D.J., Foltz, D.R., and Black, B.E. (2012). HJURP uses distinct CENP-A surfaces to recognize and to stabilize CENP-A/histone H4 for centromere assembly. *Dev Cell* 22, 749-762.

Bassi, C., Li, Y.T., Khu, K., Mateo, F., Baniyadi, P.S., Elia, A., Mason, J., Stambolic, V., Pujana, M.A., Mak, T.W., *et al.* (2016). The acetyltransferase Tip60 contributes to mammary tumorigenesis by modulating DNA repair. *Cell Death Differ*.

Behrends, C., Sowa, M.E., Gygi, S.P., and Harper, J.W. (2010). Network organization of the human autophagy system. *Nature* 466, 68-76.

Bekker-Jensen, S., and Mailand, N. (2010). Assembly and function of DNA double-strand break repair foci in mammalian cells. *DNA Repair* 9, 1219-1228.

Bennardo, N., Cheng, A., Huang, N., and Stark, J.M. (2008). Alternative-NHEJ is a mechanistically distinct pathway of mammalian chromosome break repair. *PLoS Genet* 4, e1000110.

Betermier, M., Bertrand, P., and Lopez, B.S. (2014). Is non-homologous end-joining really an inherently error-prone process? *PLoS Genet* 10, e1004086.

Bhat, W., Ahmad, S., and Cote, J. (2015). TINTIN, at the interface of chromatin, transcription elongation, and mRNA processing. *RNA Biol* 12, 486-489.

Bhatia, V., Barroso, S.I., Garcia-Rubio, M.L., Tumini, E., Herrera-Moyano, E., and Aguilera, A. (2014). BRCA2 prevents R-loop accumulation and associates with TREX-2 mRNA export factor PCID2. *Nature* 511, 362-365.

Billon, P., and Cote, J. (2013). Precise deposition of histone H2A.Z in chromatin for genome expression and maintenance. *Biochim Biophys Acta* 1819, 290-302.

Boersma, V., Moatti, N., Segura-Bayona, S., Peuscher, M.H., van der Torre, J., Wevers, B.A., Orthwein, A., Durocher, D., and Jacobs, J.J. (2015). MAD2L2 controls DNA repair at telomeres and DNA breaks by inhibiting 5' end resection. *Nature* 521, 537-540.

Bonnet, A., and Palancade, B. (2014). Regulation of mRNA trafficking by nuclear pore complexes. *Genes (Basel)* 5, 767-791.

Botuyan, M.V., Lee, J., Ward, I.M., Kim, J.E., Thompson, J.R., Chen, J., and Mer, G. (2006). Structural basis for the methylation state-specific recognition of histone H4-K20 by 53BP1 and Crb2 in DNA repair. *Cell* 127, 1361-1373.

Boudreault, A.A., Cronier, D., Selleck, W., Lacoste, N., Utley, R.T., Allard, S., Savard, J., Lane, W.S., Tan, S., and Cote, J. (2003). Yeast enhancer of polycomb defines global Esa1-dependent acetylation of chromatin. *Genes Dev* 17, 1415-1428.

Bowman, B.R., Moure, C.M., Kirtane, B.M., Welschhans, R.L., Tominaga, K., Pereira-Smith, O.M., and Quioco, F.A. (2006). Multipurpose MRG domain involved in cell senescence and proliferation exhibits structural homology to a DNA-interacting domain. *Structure* 14, 151-158.

Boyer, L.A., Latek, R.R., and Peterson, C.L. (2004). The SANT domain: a unique histone-tail-binding module? *Nat Rev Mol Cell Biol* 5, 158-163.

Bradbury, A., and Pluckthun, A. (2015). Reproducibility: Standardize antibodies used in research. *Nature* 518, 27-29.

Brady, M.E., Ozanne, D.M., Gaughan, L., Waite, I., Cook, S., Neal, D.E., and Robson, C.N. (1999). Tip60 is a nuclear hormone receptor coactivator. *J Biol Chem* 274, 17599-17604.

Brough, R., Bajrami, I., Vatcheva, R., Natrajan, R., Reis-Filho, J.S., Lord, C.J., and Ashworth, A. (2012). APRIN is a cell cycle specific BRCA2-interacting protein required for genome integrity and a predictor of outcome after chemotherapy in breast cancer. *EMBO J* 31, 1160-1176.

Buisson, R., Dion-Cote, A.M., Coulombe, Y., Launay, H., Cai, H., Stasiak, A.Z., Stasiak, A., Xia, B., and Masson, J.Y. (2010). Cooperation of breast cancer proteins PALB2 and piccolo BRCA2 in stimulating homologous recombination. *Nat Struct Mol Biol* 17, 1247-1254.

Buisson, R., Niraj, J., Pauty, J., Maity, R., Zhao, W., Coulombe, Y., Sung, P., and Masson, J.Y. (2014). Breast cancer proteins PALB2 and BRCA2 stimulate polymerase eta in recombination-associated DNA synthesis at blocked replication forks. *Cell Rep* 6, 553-564.

Bunting, S.F., Callen, E., Wong, N., Chen, H.T., Polato, F., Gunn, A., Bothmer, A., Feldhahn, N., Fernandez-Capetillo, O., Cao, L., *et al.* (2010). 53BP1 inhibits homologous recombination in Brca1-deficient cells by blocking resection of DNA breaks. *Cell* 141, 243-254.

Burke, T.W., Cook, J.G., Asano, M., and Nevins, J.R. (2001). Replication factors MCM2 and ORC1 interact with the histone acetyltransferase HBO1. *J Biol Chem* 276, 15397-15408.

Cai, Y., Jin, J., Florens, L., Swanson, S.K., Kusch, T., Li, B., Workman, J.L., Washburn, M.P., Conaway, R.C., and Conaway, J.W. (2005). The mammalian YL1 protein is a shared subunit of the TRRAP/TIP60 histone acetyltransferase and SRCAP complexes. *J Biol Chem* 280, 13665-13670.

Cai, Y., Jin, J., Tomomori-Sato, C., Sato, S., Sorokina, I., Parmely, T.J., Conaway, R.C., and Conaway, J.W. (2003). Identification of new subunits of the multiprotein mammalian TRRAP/TIP60-containing histone acetyltransferase complex. *J Biol Chem* 278, 42733-42736.

Callen, E., Di Virgilio, M., Kruhlak, M.J., Nieto-Soler, M., Wong, N., Chen, H.T., Faryabi, R.B., Polato, F., Santos, M., Starnes, L.M., *et al.* (2013). 53BP1 mediates productive and mutagenic DNA repair through distinct phosphoprotein interactions. *Cell* 153, 1266-1280.

Caron, P., Aymard, F., Iacovoni, J.S., Briois, S., Canitrot, Y., Bugler, B., Massip, L., Losada, A., and Legube, G. (2012). Cohesin protects genes against gammaH2AX Induced by DNA double-strand breaks. *PLoS Genet* 8, e1002460.

Carrozza, M.J., Florens, L., Swanson, S.K., Shia, W.J., Anderson, S., Yates, J., Washburn, M.P., and Workman, J.L. (2005a). Stable incorporation of sequence specific repressors Ash1 and Ume6 into the Rpd3L complex. *Biochim Biophys Acta* 1731, 77-87; discussion 75-76.

Carrozza, M.J., Li, B., Florens, L., Saganuma, T., Swanson, S.K., Lee, K.K., Shia, W.J., Anderson, S., Yates, J., Washburn, M.P., *et al.* (2005b). Histone H3 methylation by Set2 directs deacetylation of coding regions by Rpd3S to suppress spurious intragenic transcription. *Cell* 123, 581-592.

Carvalho, S., Vitor, A.C., Sridhara, S.C., Martins, F.B., Raposo, A.C., Desterro, J.M., Ferreira, J., and de Almeida, S.F. (2014). SETD2 is required for DNA double-strand break repair and activation of the p53-mediated checkpoint. *Elife* 3, e02482.

Ceccaldi, R., Rondinelli, B., and D'Andrea, A.D. (2016). Repair Pathway Choices and Consequences at the Double-Strand Break. *Trends Cell Biol* 26, 52-64.

Chailleux, C., Tyteca, S., Papin, C., Boudsocq, F., Puget, N., Courilleau, C., Grigoriev, M., Canitrot, Y., and Trouche, D. (2010). Physical interaction between the histone acetyl transferase Tip60 and the DNA double-strand breaks sensor MRN complex. *Biochem J* 426, 365-371.

Chan, H.M., Narita, M., Lowe, S.W., and Livingston, D.M. (2005). The p400 E1A-associated protein is a novel component of the p53 --> p21 senescence pathway. *Genes Dev* 19, 196-201.

Chang, B., Chen, Y., Zhao, Y., and Bruick, R.K. (2007). JMJD6 is a histone arginine demethylase. *Science* 318, 444-447.

Charvet, C., Wissler, M., Brauns-Schubert, P., Wang, S.J., Tang, Y., Sigloch, F.C., Mellert, H., Brandenburg, M., Lindner, S.E., Breit, B., *et al.* (2011). Phosphorylation of Tip60 by GSK-3 determines the induction of PUMA and apoptosis by p53. *Mol Cell* 42, 584-596.

Chen, E.Y., Tan, C.M., Kou, Y., Duan, Q., Wang, Z., Meirelles, G.V., Clark, N.R., and Ma'ayan, A. (2013a). Enrichr: interactive and collaborative HTML5 gene list enrichment analysis tool. *BMC bioinformatics* 14, 128.

Chen, P.B., Chen, H.V., Acharya, D., Rando, O.J., and Fazzio, T.G. (2015). R loops regulate promoter-proximal chromatin architecture and cellular differentiation. *Nat Struct Mol Biol* 22, 999-1007.

Chen, P.B., Hung, J.H., Hickman, T.L., Coles, A.H., Carey, J.F., Weng, Z., Chu, F., and Fazzio, T.G. (2013b). Hdac6 regulates Tip60-p400 function in stem cells. *Elife* 2, e01557.

Chen, X., Cui, D., Papusha, A., Zhang, X., Chu, C.D., Tang, J., Chen, K., Pan, X., and Ira, G. (2012a). The Fun30 nucleosome remodeler promotes resection of DNA double-strand break ends. *Nature* 489, 576-580.

Chen, Y., Farmer, A.A., Chen, C.F., Jones, D.C., Chen, P.L., and Lee, W.H. (1996). BRCA1 is a 220-kDa nuclear phosphoprotein that is expressed and phosphorylated in a cell cycle-dependent manner. *Cancer Res* 56, 3168-3172.

Chen, Y., Zhao, W., Yang, J.S., Cheng, Z., Luo, H., Lu, Z., Tan, M., Gu, W., and Zhao, Y. (2012b). Quantitative acetylome analysis reveals the roles of SIRT1 in regulating diverse substrates and cellular pathways. *Mol Cell Proteomics* 11, 1048-1062.

Chen, Z., Tan, J.L.H., Ingouff, M., Sundaresan, V., and Berger, F. (2007). Chromatin assembly factor 1 regulates the cell cycle but not cell fate during male gametogenesis in *Arabidopsis thaliana*. *Development* 135, 65-73.

Cheng, X., Auger, A., Altaf, M., Drouin, S., Paquet, E., Utley, R.T., Robert, F., and Cote, J. (2015). Eaf1 Links the NuA4 Histone Acetyltransferase Complex to Htz1 Incorporation and Regulation of Purine Biosynthesis. *Eukaryot Cell* 14, 535-544.

Cheng, X., and Cote, J. (2014). A new companion of elongating RNA Polymerase II: TINTIN, an independent sub-module of NuA4/TIP60 for nucleosome transactions. *Transcription* 5, e995571.

Cheng, Z., Ke, Y., Ding, X., Wang, F., Wang, H., Wang, W., Ahmed, K., Liu, Z., Xu, Y., Aikhionbare, F., *et al.* (2008). Functional characterization of TIP60 sumoylation in UV-irradiated DNA damage response. *Oncogene* 27, 931-941.

Cheung, W.L., Turner, F.B., Krishnamoorthy, T., Wolner, B., Ahn, S.H., Foley, M., Dorsey, J.A., Peterson, C.L., Berger, S.L., and Allis, C.D. (2005). Phosphorylation of histone H4 serine 1 during DNA damage requires casein kinase II in *S. cerevisiae*. *Curr Biol* 15, 656-660.

Chiolo, I., Minoda, A., Colmenares, S.U., Polyzos, A., Costes, S.V., and Karpen, G.H. (2011). Double-strand breaks in heterochromatin move outside of a dynamic HP1a domain to complete recombinational repair. *Cell* 144, 732-744.

Chittuluru, J.R., Chaban, Y., Monnet-Saksouk, J., Carrozza, M.J., Sapountzi, V., Selleck, W., Huang, J., Utley, R.T., Cramet, M., Allard, S., *et al.* (2011). Structure and nucleosome interaction of the yeast NuA4 and Piccolo-NuA4 histone acetyltransferase complexes. *Nat Struct Mol Biol* 18, 1196-1203.

Choudhary, C., Kumar, C., Gnad, F., Nielsen, M.L., Rehman, M., Walther, T.C., Olsen, J.V., and Mann, M. (2009). Lysine acetylation targets protein complexes and co-regulates major cellular functions. *Science* 325, 834-840.

Chowdhury, D., Keogh, M.C., Ishii, H., Peterson, C.L., Buratowski, S., and Lieberman, J. (2005). gamma-H2AX dephosphorylation by protein phosphatase 2A facilitates DNA double-strand break repair. *Mol Cell* 20, 801-809.

Chowdhury, D., Xu, X., Zhong, X., Ahmed, F., Zhong, J., Liao, J., Dykxhoorn, D.M., Weinstock, D.M., Pfeifer, G.P., and Lieberman, J. (2008). A PP4-phosphatase complex dephosphorylates gamma-H2AX generated during DNA replication. *Mol Cell* 31, 33-46.

Ciccia, A., and Elledge, S.J. (2010). The DNA damage response: making it safe to play with knives. *Mol Cell* 40, 179-204.

Citterio, E. (2015). Fine-tuning the ubiquitin code at DNA double-strand breaks: deubiquitinating enzymes at work. *Front Genet* 6, 282.

Clapier, C.R., and Cairns, B.R. (2009). The biology of chromatin remodeling complexes. *Annu Rev Biochem* 78, 273-304.

Clarke, A.S., Samal, E., and Pillus, L. (2006). Distinct roles for the essential MYST family HAT Esa1p in transcriptional silencing. *Mol Biol Cell* 17, 1744-1757.

Clouaire, T., and Legube, G. (2015). DNA double strand break repair pathway choice: a chromatin based decision? *Nucleus* 6, 107-113.

Consortium, E.P. (2012). An integrated encyclopedia of DNA elements in the human genome. *Nature* 489, 57-74.

Costanzi, C., and Pehrson, J.R. (1998). Histone macroH2A1 is concentrated in the inactive X chromosome of female mammals. *Nature* 393, 599-601.

Costelloe, T., Louge, R., Tomimatsu, N., Mukherjee, B., Martini, E., Khadaroo, B., Dubois, K., Wiegant, W.W., Thierry, A., Burma, S., *et al.* (2012). The yeast Fun30 and human SMARCAD1 chromatin remodellers promote DNA end resection. *Nature* 489, 581-584.

Courilleau, C., Chailleux, C., Jauneau, A., Grimal, F., Briois, S., Boutet-Robinet, E., Boudsocq, F., Trouche, D., and Canitrot, Y. (2012). The chromatin remodeler p400 ATPase facilitates Rad51-mediated repair of DNA double-strand breaks. *J Cell Biol* 199, 1067-1081.

Couzens, A.L., Knight, J.D., Kean, M.J., Teo, G., Weiss, A., Dunham, W.H., Lin, Z.Y., Bagshaw, R.D., Sicheri, F., Pawson, T., *et al.* (2013). Protein interaction network of the mammalian Hippo pathway reveals mechanisms of kinase-phosphatase interactions. *Sci Signal* 6, rs15.

Cowell, I.G., Sunter, N.J., Singh, P.B., Austin, C.A., Durkacz, B.W., and Tilby, M.J. (2007). gammaH2AX foci form preferentially in euchromatin after ionising-radiation. *PLoS One* 2, e1057.

Craig, J.M. (2005). Heterochromatin--many flavours, common themes. *Bioessays* 27, 17-28.

D'Arcy, P., Wang, X., and Linder, S. (2015). Deubiquitinase inhibition as a cancer therapeutic strategy. *Pharmacol Ther* 147, 32-54.

Dalvai, M., Loehr, J., Jacquet, K., Huard, C.C., Roques, C., Herst, P., Cote, J., and Doyon, Y. (2015). A Scalable Genome-Editing-Based Approach for Mapping Multiprotein Complexes in Human Cells. *Cell Rep* 13, 621-633.

Dancy, B.M., and Cole, P.A. (2015). Protein lysine acetylation by p300/CBP. *Chem Rev* 115, 2419-2452.

Dantuma, N.P., and van Attikum, H. (2016). Spatiotemporal regulation of posttranslational modifications in the DNA damage response. *EMBO J* 35, 6-23.

Dar, A., Shibata, E., and Dutta, A. (2013). Deubiquitination of Tip60 by USP7 determines the activity of the p53-dependent apoptotic pathway. *Mol Cell Biol* 33, 3309-3320.

Daugaard, M., Baude, A., Fugger, K., Povlsen, L.K., Beck, H., Sorensen, C.S., Petersen, N.H., Sorensen, P.H., Lukas, C., Bartek, J., *et al.* (2012). LEDGF (p75) promotes DNA-end resection and homologous recombination. *Nat Struct Mol Biol* 19, 803-810.

De Braekeleer, E., Auffret, R., Douet-Guilbert, N., Basinko, A., Le Bris, M.J., Morel, F., and De Braekeleer, M. (2013). Recurrent translocation (10;17)(p15;q21) in acute poorly differentiated myeloid leukemia likely results in ZMYND11-MBTD1 fusion. *Leuk Lymphoma*.

de Rooij, J.D., van den Heuvel-Eibrink, M.M., Kollen, W.J., Sonneveld, E., Kaspers, G.J., Beverloo, H.B., Fornerod, M., Pieters, R., and Zwaan, C.M. (2016). Recurrent translocation t(10;17)(p15;q21) in minimally differentiated acute myeloid leukemia results in ZMYND11/MBTD1 fusion. *Genes Chromosomes Cancer* 55, 237-241.

DeKever, R.C., Choi, V.M., Moehle, E.A., Paschon, D.E., Hockemeyer, D., Meijnsing, S.H., Sancak, Y., Cui, X., Steine, E.J., Miller, J.C., *et al.* (2010). Functional genomics, proteomics, and regulatory DNA analysis in

isogenic settings using zinc finger nuclease-driven transgenesis into a safe harbor locus in the human genome. *Genome research* 20, 1133-1142.

Denslow, S.A., and Wade, P.A. (2007). The human Mi-2/NuRD complex and gene regulation. *Oncogene* 26, 5433-5438.

Dewaele, B., Przybyl, J., Quattrone, A., Finalet Ferreira, J., Vanspauwen, V., Geerdens, E., Gianfelici, V., Kalender, Z., Wozniak, A., Moerman, P., *et al.* (2014). Identification of a novel, recurrent MBTD1-CXorf67 fusion in low-grade endometrial stromal sarcoma. *Int J Cancer* 134, 1112-1122.

Dikic, I., Wakatsuki, S., and Walters, K.J. (2009). Ubiquitin-binding domains - from structures to functions. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10, 659-671.

Dillon, S.C., Zhang, X., Trievel, R.C., and Cheng, X. (2005). The SET-domain protein superfamily: protein lysine methyltransferases. *Genome Biol* 6, 227.

Douglas, P., Zhong, J., Ye, R., Moorhead, G.B., Xu, X., and Lees-Miller, S.P. (2010). Protein phosphatase 6 interacts with the DNA-dependent protein kinase catalytic subunit and dephosphorylates gamma-H2AX. *Mol Cell Biol* 30, 1368-1381.

Downs, J.A., Allard, S., Jobin-Robitaille, O., Javaheri, A., Auger, A., Bouchard, N., Kron, S.J., Jackson, S.P., and Cote, J. (2004). Binding of chromatin-modifying activities to phosphorylated histone H2A at DNA damage sites. *Mol Cell* 16, 979-990.

Doyon, J.B., Zeitler, B., Cheng, J., Cheng, A.T., Cherone, J.M., Santiago, Y., Lee, A.H., Vo, T.D., Doyon, Y., Miller, J.C., *et al.* (2011). Rapid and efficient clathrin-mediated endocytosis revealed in genome-edited mammalian cells. *Nat Cell Biol* 13, 331-337.

Doyon, Y., Cayrou, C., Ullah, M., Landry, A.J., Cote, V., Selleck, W., Lane, W.S., Tan, S., Yang, X.J., and Cote, J. (2006). ING tumor suppressor proteins are critical regulators of chromatin acetylation required for genome expression and perpetuation. *Mol Cell* 21, 51-64.

Doyon, Y., and Cote, J. (2004). The highly conserved and multifunctional NuA4 HAT complex. *Curr Opin Genet Dev* 14, 147-154.

Doyon, Y., Selleck, W., Lane, W.S., Tan, S., and Cote, J. (2004). Structural and functional conservation of the NuA4 histone acetyltransferase complex from yeast to humans. *Mol Cell Biol* 24, 1884-1896.

Du, P., Kibbe, W.A., and Lin, S.M. (2008). lumi: a pipeline for processing Illumina microarray. *Bioinformatics* 24, 1547-1548.

Dueva, R., and Iliakis, G. (2013). Alternative pathways of non-homologous end joining (NHEJ) in genomic instability and cancer. *Translational Cancer Research* 2, 163-177.

Dulev, S., Tkach, J., Lin, S., and Batada, N.N. (2014). SET8 methyltransferase activity during the DNA double-strand break response is required for recruitment of 53BP1. *EMBO Rep* 15, 1163-1174.

Durant, M., and Pugh, B.F. (2007). NuA4-Directed Chromatin Transactions throughout the *Saccharomyces cerevisiae* Genome. *Molecular and Cellular Biology* 27, 5327-5335.

Dyda, F., Klein, D.C., and Hickman, A.B. (2000). GCN5-related N-acetyltransferases: a structural overview. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 29, 81-103.

Dyer, P.N., Edayathumangalam, R.S., White, C.L., Bao, Y., Chakravarthy, S., Muthurajan, U.M., and Luger, K. (2004). Reconstitution of nucleosome core particles from recombinant histones and DNA. *Methods Enzymol* 375, 23-44.

Enervald, E., Du, L., Visnes, T., Bjorkman, A., Lindgren, E., Wincent, J., Borck, G., Colleaux, L., Cormier-Daire, V., van Gent, D.C., *et al.* (2013). A regulatory role for the cohesin loader NIPBL in nonhomologous end joining during immunoglobulin class switch recombination. *J Exp Med* 210, 2503-2513.

Ernst, J., Kheradpour, P., Mikkelsen, T.S., Shores, N., Ward, L.D., Epstein, C.B., Zhang, X., Wang, L., Issner, R., Coyne, M., *et al.* (2011). Mapping and analysis of chromatin state dynamics in nine human cell types. *Nature* 473, 43-49.

Eryilmaz, J., Pan, P., Amaya, M.F., Allali-Hassani, A., Dong, A., Adams-Cioaba, M.A., Mackenzie, F., Vedadi, M., and Min, J. (2009). Structural studies of a four-MBT repeat protein MBTD1. *PLoS One* 4, e7274.

Esashi, F., Christ, N., Gannon, J., Liu, Y., Hunt, T., Jasin, M., and West, S.C. (2005). CDK-dependent phosphorylation of BRCA2 as a regulatory mechanism for recombinational repair. *Nature* 434, 598-604.

Escribano-Diaz, C., Orthwein, A., Fradet-Turcotte, A., Xing, M., Young, J.T., Tkac, J., Cook, M.A., Rosebrock, A.P., Munro, M., Canny, M.D., *et al.* (2013). A cell cycle-dependent regulatory circuit composed of 53BP1-RIF1 and BRCA1-CtIP controls DNA repair pathway choice. *Mol Cell* 49, 872-883.

Fan, J.Y., Gordon, F., Luger, K., Hansen, J.C., and Tremethick, D.J. (2002). The essential histone variant H2A.Z regulates the equilibrium between different chromatin conformational states. *Nat Struct Biol* 9, 172-176.

Fang, J., Feng, Q., Ketel, C.S., Wang, H., Cao, R., Xia, L., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Simon, J.A., and Zhang, Y. (2002). Purification and functional characterization of SET8, a nucleosomal histone H4-lysine 20-specific methyltransferase. *Curr Biol* 12, 1086-1099.

Fazio, T.G., Huff, J.T., and Panning, B. (2008). An RNAi screen of chromatin proteins identifies Tip60-p400 as a regulator of embryonic stem cell identity. *Cell* 134, 162-174.

Feng, L., and Chen, J. (2012). The E3 ligase RNF8 regulates KU80 removal and NHEJ repair. *Nat Struct Mol Biol* 19, 201-206.

Feng, L., Li, N., Li, Y., Wang, J., Gao, M., Wang, W., and Chen, J. (2015). Cell cycle-dependent inhibition of 53BP1 signaling by BRCA1. *Cell Discovery* 1, 15019.

Feng, Q., Wang, H., Ng, H.H., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Struhl, K., and Zhang, Y. (2002). Methylation of H3-lysine 79 is mediated by a new family of HMTases without a SET domain. *Curr Biol* 12, 1052-1058.

Fernandez-Capetillo, O., Allis, C.D., and Nussenzweig, A. (2004). Phosphorylation of histone H2B at DNA double-strand breaks. *J Exp Med* 199, 1671-1677.

Filippakopoulos, P., and Knapp, S. (2014). Targeting bromodomains: epigenetic readers of lysine acetylation. *Nat Rev Drug Discov* 13, 337-356.

Filippakopoulos, P., Picaud, S., Mangos, M., Keates, T., Lambert, J.P., Barsyte-Lovejoy, D., Felletar, I., Volkmer, R., Muller, S., Pawson, T., *et al.* (2012). Histone recognition and large-scale structural analysis of the human bromodomain family. *Cell* 149, 214-231.

Fnu, S., Williamson, E.A., De Haro, L.P., Brenneman, M., Wray, J., Shaheen, M., Radhakrishnan, K., Lee, S.H., Nickoloff, J.A., and Hromas, R. (2011). Methylation of histone H3 lysine 36 enhances DNA repair by nonhomologous end-joining. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, 540-545.

Fradet-Turcotte, A., Canny, M.D., Escribano-Diaz, C., Orthwein, A., Leung, C.C., Huang, H., Landry, M.C., Kitevski-LeBlanc, J., Noordermeer, S.M., Sicheri, F., *et al.* (2013). 53BP1 is a reader of the DNA-damage-induced H2A Lys 15 ubiquitin mark. *Nature* 499, 50-54.

Francia, S., Michelini, F., Saxena, A., Tang, D., de Hoon, M., Anelli, V., Mione, M., Carninci, P., and d'Adda di Fagagna, F. (2012). Site-specific DICER and DROSHA RNA products control the DNA-damage response. *Nature* 488, 231-235.

Frank, S.R., Parisi, T., Taubert, S., Fernandez, P., Fuchs, M., Chan, H.M., Livingston, D.M., and Amati, B. (2003). MYC recruits the TIP60 histone acetyltransferase complex to chromatin. *EMBO Rep* 4, 575-580.

Frit, P., Barboule, N., Yuan, Y., Gomez, D., and Calsou, P. (2014). Alternative end-joining pathway(s): bricolage at DNA breaks. *DNA Repair (Amst)* 17, 81-97.

Fuchs, M., Gerber, J., Drapkin, R., Sif, S., Ikura, T., Ogrzyzko, V., Lane, W.S., Nakatani, Y., and Livingston, D.M. (2001). The p400 complex is an essential E1A transformation target. *Cell* 106, 297-307.

Galanty, Y., Belotserkovskaya, R., Coates, J., Polo, S., Miller, K.M., and Jackson, S.P. (2009). Mammalian SUMO E3-ligases PIAS1 and PIAS4 promote responses to DNA double-strand breaks. *Nature* 462, 935-939.

Galarnau, L., Nourani, A., Boudreault, A.A., Zhang, Y., Heliot, L., Allard, S., Savard, J., Lane, W.S., Stillman, D.J., and Cote, J. (2000). Multiple links between the NuA4 histone acetyltransferase complex and epigenetic control of transcription. *Mol Cell* 5, 927-937.

Gallant, P. (2007). Control of transcription by Pontin and Reptin. *Trends Cell Biol* 17, 187-192.

Gamble, M.J., and Kraus, W.L. (2010). Multiple facets of the unique histone variant macroH2A: from genomics to cell biology. *Cell Cycle* 9, 2568-2574.

Ganesan, S., Silver, D.P., Greenberg, R.A., Avni, D., Drapkin, R., Miron, A., Mok, S.C., Randrianarison, V., Brodie, S., Salstrom, J., *et al.* (2002). BRCA1 supports XIST RNA concentration on the inactive X chromosome. *Cell* 111, 393-405.

Gangaraju, V.K., and Bartholomew, B. (2007). Mechanisms of ATP dependent chromatin remodeling. *Mutat Res* 618, 3-17.

Gavin, A.C., Aloy, P., Grandi, P., Krause, R., Boesche, M., Marzioch, M., Rau, C., Jensen, L.J., Bastuck, S., Dumpelfeld, B., *et al.* (2006). Proteome survey reveals modularity of the yeast cell machinery. *Nature* 440, 631-636.

Gavin, A.C., Maeda, K., and Kuhner, S. (2011). Recent advances in charting protein-protein interaction: mass spectrometry-based approaches. *Current opinion in biotechnology* 22, 42-49.

Gevry, N., Hardy, S., Jacques, P.E., Laflamme, L., Svtelis, A., Robert, F., and Gaudreau, L. (2009). Histone H2A.Z is essential for estrogen receptor signaling. *Genes Dev* 23, 1522-1533.

Ghezraoui, H., Piganeau, M., Renouf, B., Renaud, J.B., Sallmyr, A., Ruis, B., Oh, S., Tomkinson, A.E., Hendrickson, E.A., Giovannangeli, C., *et al.* (2014). Chromosomal translocations in human cells are generated by canonical nonhomologous end-joining. *Mol Cell* 55, 829-842.

Goldberg, A.D., Banaszynski, L.A., Noh, K.M., Lewis, P.W., Elsaesser, S.J., Stadler, S., Dewell, S., Law, M., Guo, X., Li, X., *et al.* (2010). Distinct factors control histone variant H3.3 localization at specific genomic regions. *Cell* 140, 678-691.

Goldstein, M., Derheimer, F.A., Tait-Mulder, J., and Kastan, M.B. (2013). Nucleolin mediates nucleosome disruption critical for DNA double-strand break repair. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110, 16874-16879.

Gong, F., Chiu, L.Y., Cox, B., Aymard, F., Clouaire, T., Leung, J.W., Cammarata, M., Perez, M., Agarwal, P., Brodbelt, J.S., *et al.* (2015). Screen identifies bromodomain protein ZMYND8 in chromatin recognition of transcription-associated DNA damage that promotes homologous recombination. *Genes Dev* 29, 197-211.

Goodarzi, A.A., Kurka, T., and Jeggo, P.A. (2011). KAP-1 phosphorylation regulates CHD3 nucleosome remodeling during the DNA double-strand break response. *Nat Struct Mol Biol* 18, 831-839.

Goodarzi, A.A., Noon, A.T., Deckbar, D., Ziv, Y., Shiloh, Y., Lobrich, M., and Jeggo, P.A. (2008). ATM signaling facilitates repair of DNA double-strand breaks associated with heterochromatin. *Mol Cell* 31, 167-177.

Goodarzi, A.A., Yu, Y., Riballo, E., Douglas, P., Walker, S.A., Ye, R., Harer, C., Marchetti, C., Morrice, N., Jeggo, P.A., *et al.* (2006). DNA-PK autophosphorylation facilitates Artemis endonuclease activity. *EMBO J* 25, 3880-3889.

Gorrini, C., Squatrito, M., Luise, C., Syed, N., Perna, D., Wark, L., Martinato, F., Sardella, D., Verrecchia, A., Bennett, S., *et al.* (2007). Tip60 is a haplo-insufficient tumour suppressor required for an oncogene-induced DNA damage response. *Nature* 448, 1063-1067.

Gorynia, S., Bandejas, T.M., Pinho, F.G., McVey, C.E., Vornrhein, C., Round, A., Svergun, D.I., Donner, P., Matias, P.M., and Carrondo, M.A. (2011). Structural and functional insights into a dodecameric molecular machine - the RuvBL1/RuvBL2 complex. *J Struct Biol* 176, 279-291.

Gospodinov, A., Vaissiere, T., Krastev, D.B., Legube, G., Anachkova, B., and Herceg, Z. (2011). Mammalian Ino80 mediates double-strand break repair through its role in DNA end strand resection. *Mol Cell Biol* 31, 4735-4745.

Goudreault, M., D'Ambrosio, L.M., Kean, M.J., Mullin, M.J., Larsen, B.G., Sanchez, A., Chaudhry, S., Chen, G.I., Sicheri, F., Nesvizhskii, A.I., *et al.* (2009). A PP2A phosphatase high density interaction network identifies a novel striatin-interacting phosphatase and kinase complex linked to the cerebral cavernous malformation 3 (CCM3) protein. *Molecular & cellular proteomics : MCP* 8, 157-171.

Gozani, O., Karuman, P., Jones, D.R., Ivanov, D., Cha, J., Lugovskoy, A.A., Baird, C.L., Zhu, H., Field, S.J., Lessnick, S.L., *et al.* (2003). The PHD finger of the chromatin-associated protein ING2 functions as a nuclear phosphoinositide receptor. *Cell* 114, 99-111.

Grezy, A., Chevillard-Briet, M., Trouche, D., and Escaffit, F. (2016). Control of genetic stability by a new heterochromatin compaction pathway involving the Tip60 histone acetyltransferase. *Mol Biol Cell* 27, 599-607.

Grigoletto, A., Lestienne, P., and Rosenbaum, J. (2011). The multifaceted proteins Reptin and Pontin as major players in cancer. *Biochim Biophys Acta* 1815, 147-157.

Gudjonsson, T., Altmeyer, M., Savic, V., Toledo, L., Dinant, C., Grofte, M., Bartkova, J., Poulsen, M., Oka, Y., Bekker-Jensen, S., *et al.* (2012). TRIP12 and UBR5 suppress spreading of chromatin ubiquitylation at damaged chromosomes. *Cell* 150, 697-709.

Guillemette, B., Bataille, A.R., Gevry, N., Adam, M., Blanchette, M., Robert, F., and Gaudreau, L. (2005). Variant histone H2A.Z is globally localized to the promoters of inactive yeast genes and regulates nucleosome positioning. *PLoS Biol* 3, e384.

Guo, R., Zheng, L., Park, J.W., Lv, R., Chen, H., Jiao, F., Xu, W., Mu, S., Wen, H., Qiu, J., *et al.* (2014). BS69/ZMYND11 reads and connects histone H3.3 lysine 36 trimethylation-decorated chromatin to regulated pre-mRNA processing. *Mol Cell* 56, 298-310.

Gupta, A., Hunt, C.R., Hegde, M.L., Chakraborty, S., Udayakumar, D., Horikoshi, N., Singh, M., Ramnarain, D.B., Hittelman, W.N., Namjoshi, S., *et al.* (2014). MOF phosphorylation by ATM regulates 53BP1-mediated double-strand break repair pathway choice. *Cell Rep* 8, 177-189.

Gurard-Levin, Z.A., Quivy, J.P., and Almouzni, G. (2014). Histone chaperones: assisting histone traffic and nucleosome dynamics. *Annu Rev Biochem* 83, 487-517.

Gursoy-Yuzugullu, O., Ayrapetov, M.K., and Price, B.D. (2015). Histone chaperone Anp32e removes H2A.Z from DNA double-strand breaks and promotes nucleosome reorganization and DNA repair. *Proc Natl Acad Sci U S A*.

Guruharsha, K.G., Rual, J.F., Zhai, B., Mintseris, J., Vaidya, P., Vaidya, N., Beekman, C., Wong, C., Rhee, D.Y., Cenaj, O., *et al.* (2011). A protein complex network of *Drosophila melanogaster*. *Cell* 147, 690-703.

Hakme, A., Huber, A., Dolle, P., and Schreiber, V. (2008). The macroPARP genes Parp-9 and Parp-14 are developmentally and differentially regulated in mouse tissues. *Dev Dyn* 237, 209-215.

Hartlerode, A.J., and Scully, R. (2009). Mechanisms of double-strand break repair in somatic mammalian cells. *Biochem J* 423, 157-168.

Hatchi, E., Skourti-Stathaki, K., Ventz, S., Pinello, L., Yen, A., Kamieniarz-Gdula, K., Dimitrov, S., Pathania, S., McKinney, K.M., Eaton, M.L., *et al.* (2015). BRCA1 recruitment to transcriptional pause sites is required for R-loop-driven DNA damage repair. *Mol Cell* 57, 636-647.

Hateboer, G., Gennissen, A., Ramos, Y.F., Kerkhoven, R.M., Sonntag-Buck, V., Stunnenberg, H.G., and Bernards, R. (1995). BS69, a novel adenovirus E1A-associated protein that inhibits E1A transactivation. *EMBO J* 14, 3159-3169.

Hayakawa, T., Ohtani, Y., Hayakawa, N., Shinmyozu, K., Saito, M., Ishikawa, F., and Nakayama, J. (2007). RBP2 is an MRG15 complex component and down-regulates intragenic histone H3 lysine 4 methylation. *Genes Cells* 12, 811-826.

Hegemann, B., Hutchins, J.R., Hudecz, O., Novatchkova, M., Rameseder, J., Sykora, M.M., Liu, S., Mazanek, M., Lenart, P., Heriche, J.K., *et al.* (2011). Systematic phosphorylation analysis of human mitotic protein complexes. *Science signaling* 4, rs12.

Heisel, S., Habel, N.C., Schuetz, N., Ruggieri, A., and Meese, E. (2010). The YEATS family member GAS41 interacts with the general transcription factor TFIIF. *BMC Mol Biol* 11, 53.

Hejna, J., Bruun, D., Pauw, D., and Moses, R.E. (2010). A FANCD2 domain activates Tip60-dependent apoptosis. *Cell Biol Int* 34, 893-899.

Hejna, J., Holtorf, M., Hines, J., Mathewson, L., Hemphill, A., Al-Dhalimy, M., Olson, S.B., and Moses, R.E. (2008). Tip60 is required for DNA interstrand cross-link repair in the Fanconi anemia pathway. *J Biol Chem* 283, 9844-9851.

Hentschel, C.C., and Birnstiel, M.L. (1981). The organization and expression of histone gene families. *Cell* 25, 301-313.

Heo, K., Kim, H., Choi, S.H., Choi, J., Kim, K., Gu, J., Lieber, M.R., Yang, A.S., and An, W. (2008). FACT-mediated exchange of histone variant H2AX regulated by phosphorylation of H2AX and ADP-ribosylation of Spt16. *Mol Cell* 30, 86-97.

Hlubek, F., Lohberg, C., Meiler, J., Jung, A., Kirchner, T., and Brabletz, T. (2001). Tip60 is a cell-type-specific transcriptional regulator. *J Biochem* 129, 635-641.

Ho, Y., Gruhler, A., Heilbut, A., Bader, G.D., Moore, L., Adams, S.L., Millar, A., Taylor, P., Bennett, K., Boutilier, K., *et al.* (2002). Systematic identification of protein complexes in *Saccharomyces cerevisiae* by mass spectrometry. *Nature* 415, 180-183.

Hockemeyer, D., Soldner, F., Beard, C., Gao, Q., Mitalipova, M., DeKolver, R.C., Katibah, G.E., Amora, R., Boydston, E.A., Zeitler, B., *et al.* (2009a). Efficient targeting of expressed and silent genes in human ESCs and iPSCs using zinc-finger nucleases. *Nature biotechnology* 27, 851-857.

Hockemeyer, D., Soldner, F., Beard, C., Gao, Q., Mitalipova, M., DeKolver, R.C., Katibah, G.E., Amora, R., Boydston, E.A., Zeitler, B., *et al.* (2009b). Efficient targeting of expressed and silent genes in human ESCs and iPSCs using zinc-finger nucleases. *Nat Biotechnol* 27, 851-857.

Hockemeyer, D., Wang, H., Kiani, S., Lai, C.S., Gao, Q., Cassady, J.P., Cost, G.J., Zhang, L., Santiago, Y., Miller, J.C., *et al.* (2011). Genetic engineering of human pluripotent cells using TALE nucleases. *Nature biotechnology* 29, 731-734.

Honda, H., Takubo, K., Oda, H., Kosaki, K., Tazaki, T., Yamasaki, N., Miyazaki, K., Moore, K.A., Honda, Z., Suda, T., *et al.* (2011). Hmp, an mbt domain-containing protein, plays essential roles in hematopoietic stem cell function and skeletal formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, 2468-2473.

Horikawa, I., Tanaka, H., Yuasa, Y., Suzuki, M., Shimizu, M., and Oshimura, M. (1995). Forced expression of YL-1 protein suppresses the anchorage-independent growth of Kirsten sarcoma virus-transformed NIH3T3 cells. *Exp Cell Res* 220, 11-17.

Houten, J.K., and Nasser, R. (2012). Vertebral anomalies in siblings with Fanconi anemia. *Pediatr Neurosurg* 48, 264-266.

Hsiao, K.Y., and Mizzen, C.A. (2013). Histone H4 deacetylation facilitates 53BP1 DNA damage signaling and double-strand break repair. *J Mol Cell Biol* 5, 157-165.

Hsu, P.D., Lander, E.S., and Zhang, F. (2014). Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering. *Cell* 157, 1262-1278.

Hsu, P.D., Scott, D.A., Weinstein, J.A., Ran, F.A., Konermann, S., Agarwala, V., Li, Y., Fine, E.J., Wu, X., Shalem, O., *et al.* (2013). DNA targeting specificity of RNA-guided Cas9 nucleases. *Nature biotechnology* 31, 827-832.

Hu, Y., Fisher, J.B., Koprowski, S., McAllister, D., Kim, M.S., and Lough, J. (2009). Homozygous disruption of the Tip60 gene causes early embryonic lethality. *Dev Dyn* 238, 2912-2921.

Huang, F., Paulson, A., Dutta, A., Venkatesh, S., Smolle, M., Abmayr, S.M., and Workman, J.L. (2014a). Histone acetyltransferase Enok regulates oocyte polarization by promoting expression of the actin nucleation factor spire. *Genes Dev* 28, 2750-2763.

Huang, J., and Tan, S. (2013). Piccolo NuA4-catalyzed acetylation of nucleosomal histones: critical roles of an Esa1 Tudor/chromo barrel loop and an Epl1 enhancer of polycomb A (EPCa) basic region. *Mol Cell Biol* 33, 159-169.

Huang, X., Spencer, G.J., Lynch, J.T., Ciceri, F., Somerville, T.D., and Somervaille, T.C. (2014b). Enhancers of Polycomb EPC1 and EPC2 sustain the oncogenic potential of MLL leukemia stem cells. *Leukemia* 28, 1081-1091.

Hutchins, J.R., Toyoda, Y., Hegemann, B., Poser, I., Heriche, J.K., Sykora, M.M., Augsburg, M., Hudecz, O., Buschhorn, B.A., Bulkescher, J., *et al.* (2010). Systematic analysis of human protein complexes identifies chromosome segregation proteins. *Science* 328, 593-599.

Huttlin, E.L., Ting, L., Bruckner, R.J., Gebreab, F., Gygi, M.P., Szpyt, J., Tam, S., Zarraga, G., Colby, G., Baltier, K., *et al.* (2015). The BioPlex Network: A Systematic Exploration of the Human Interactome. *Cell* 162, 425-440.

Iacovoni, J.S., Caron, P., Lassadi, I., Nicolas, E., Massip, L., Trouche, D., and Legube, G. (2010). High-resolution profiling of gammaH2AX around DNA double strand breaks in the mammalian genome. *EMBO J* 29, 1446-1457.

Iizuka, M., and Stillman, B. (1999). Histone acetyltransferase HBO1 interacts with the ORC1 subunit of the human initiator protein. *J Biol Chem* 274, 23027-23034.

Ikura, M., Furuya, K., Matsuda, S., Matsuda, R., Shima, H., Adachi, J., Matsuda, T., Shiraki, T., and Ikura, T. (2015). Acetylation of Histone H2AX at Lys 5 by the TIP60 Histone Acetyltransferase Complex Is Essential for the Dynamic Binding of NBS1 to Damaged Chromatin. *Mol Cell Biol* 35, 4147-4157.

Ikura, T., Ogryzko, V.V., Grigoriev, M., Groisman, R., Wang, J., Horikoshi, M., Scully, R., Qin, J., and Nakatani, Y. (2000). Involvement of the TIP60 histone acetylase complex in DNA repair and apoptosis. *Cell* 102, 463-473.

Ikura, T., Tashiro, S., Kakino, A., Shima, H., Jacob, N., Amunugama, R., Yoder, K., Izumi, S., Kuraoka, I., Tanaka, K., *et al.* (2007). DNA damage-dependent acetylation and ubiquitination of H2AX enhances chromatin dynamics. *Mol Cell Biol* 27, 7028-7040.

Ismail, I.H., Gagne, J.-P., Genois, M.-M., Strickfaden, H., McDonald, D., Xu, Z., Poirier, G.G., Masson, J.-Y., and Hendzel, M.J. (2015). The RNF138 E3 ligase displaces Ku to promote DNA end resection and regulate DNA repair pathway choice. *Nat Cell Biol* 17, 1446-1457.

Iyer, N.G., Ozdag, H., and Caldas, C. (2004). p300/CBP and cancer. *Oncogene* 23, 4225-4231.

Jackson, S.P., and Durocher, D. (2013). Regulation of DNA damage responses by ubiquitin and SUMO. *Mol Cell* 49, 795-807.

Jacobs, S.A., Taverna, S.D., Zhang, Y., Briggs, S.D., Li, J., Eissenberg, J.C., Allis, C.D., and Khorasanizadeh, S. (2001). Specificity of the HP1 chromo domain for the methylated N-terminus of histone H3. *EMBO J* 20, 5232-5241.

Jasin, M., and Rothstein, R. (2013). Repair of strand breaks by homologous recombination. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 5, a012740.

Javaheri, A., Wysocki, R., Jobin-Robitaille, O., Altaf, M., Cote, J., and Kron, S.J. (2006). Yeast G1 DNA damage checkpoint regulation by H2A phosphorylation is independent of chromatin remodeling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 13771-13776.

Jeong, K.W., Kim, K., Situ, A.J., Ulmer, T.S., An, W., and Stallcup, M.R. (2011). Recognition of enhancer element-specific histone methylation by TIP60 in transcriptional activation. *Nat Struct Mol Biol* 18, 1358-1365.

Jette, N., and Lees-Miller, S.P. (2015). The DNA-dependent protein kinase: A multifunctional protein kinase with roles in DNA double strand break repair and mitosis. *Prog Biophys Mol Biol* 117, 194-205.

Jha, S., Shibata, E., and Dutta, A. (2008). Human Rvb1/Tip49 is required for the histone acetyltransferase activity of Tip60/NuA4 and for the downregulation of phosphorylation on H2AX after DNA damage. *Mol Cell Biol* 28, 2690-2700.

Jha, S., Vande Pol, S., Banerjee, N.S., Dutta, A.B., Chow, L.T., and Dutta, A. (2010). Destabilization of TIP60 by human papillomavirus E6 results in attenuation of TIP60-dependent transcriptional regulation and apoptotic pathway. *Mol Cell* 38, 700-711.

Jin, J., Cai, Y., Yao, T., Gottschalk, A.J., Florens, L., Swanson, S.K., Gutierrez, J.L., Coleman, M.K., Workman, J.L., Mushegian, A., *et al.* (2005). A mammalian chromatin remodeling complex with similarities to the yeast INO80 complex. *J Biol Chem* 280, 41207-41212.

Jorgensen, S., Schotta, G., and Sorensen, C.S. (2013). Histone H4 lysine 20 methylation: key player in epigenetic regulation of genomic integrity. *Nucleic Acids Res* 41, 2797-2806.

Joshi, A.A., and Struhl, K. (2005). Eaf3 chromodomain interaction with methylated H3-K36 links histone deacetylation to Pol II elongation. *Mol Cell* 20, 971-978.

Joung, J.K., and Sander, J.D. (2013). TALENs: a widely applicable technology for targeted genome editing. *Nat Rev Mol Cell Biol* 14, 49-55.

Kachirskaja, I., Shi, X., Yamaguchi, H., Tanoue, K., Wen, H., Wang, E.W., Appella, E., and Gozani, O. (2008). Role for 53BP1 Tudor domain recognition of p53 dimethylated at lysine 382 in DNA damage signaling. *J Biol Chem* 283, 34660-34666.

Kaidi, A., and Jackson, S.P. (2013). KAT5 tyrosine phosphorylation couples chromatin sensing to ATM signalling. *Nature* 498, 70-74.

Kaidi, A., Weinert, B.T., Choudhary, C., and Jackson, S.P. (2010). Human SIRT6 promotes DNA end resection through CtIP deacetylation. *Science* 329, 1348-1353.

Kakarougkas, A., Ismail, A., Chambers, A.L., Riballo, E., Herbert, A.D., Kunzel, J., Lobrich, M., Jeggo, P.A., and Downs, J.A. (2014). Requirement for PBAF in transcriptional repression and repair at DNA breaks in actively transcribed regions of chromatin. *Mol Cell* 55, 723-732.

Kalb, R., Latwiel, S., Baymaz, H.I., Jansen, P.W., Muller, C.W., Vermeulen, M., and Muller, J. (2014). Histone H2A monoubiquitination promotes histone H3 methylation in Polycomb repression. *Nat Struct Mol Biol* 21, 569-571.

Kalocsay, M., Hiller, N.J., and Jentsch, S. (2009). Chromosome-wide Rad51 spreading and SUMO-H2A.Z-dependent chromosome fixation in response to a persistent DNA double-strand break. *Mol Cell* 33, 335-343.

Kanemaki, M., Kurokawa, Y., Matsu-ura, T., Makino, Y., Masani, A., Okazaki, K., Morishita, T., and Tamura, T.A. (1999). TIP49b, a new RuvB-like DNA helicase, is included in a complex together with another RuvB-like DNA helicase, TIP49a. *J Biol Chem* 274, 22437-22444.

Kapoor-Vazirani, P., and Vertino, P.M. (2014). A dual role for the histone methyltransferase PR-SET7/SETD8 and histone H4 lysine 20 monomethylation in the local regulation of RNA polymerase II pausing. *J Biol Chem* 289, 7425-7437.

Karras, G.I., Kustatscher, G., Buhecha, H.R., Allen, M.D., Pugieux, C., Sait, F., Bycroft, M., and Ladurner, A.G. (2005). The macro domain is an ADP-ribose binding module. *EMBO J* 24, 1911-1920.

Keogh, M.C., Kim, J.A., Downey, M., Fillingham, J., Chowdhury, D., Harrison, J.C., Onishi, M., Datta, N., Galicia, S., Emili, A., *et al.* (2006a). A phosphatase complex that dephosphorylates gammaH2AX regulates DNA damage checkpoint recovery. *Nature* 439, 497-501.

Keogh, M.C., Kurdistani, S.K., Morris, S.A., Ahn, S.H., Podolny, V., Collins, S.R., Schuldiner, M., Chin, K., Punna, T., Thompson, N.J., *et al.* (2005). Cotranscriptional set2 methylation of histone H3 lysine 36 recruits a repressive Rpd3 complex. *Cell* 123, 593-605.

Keogh, M.C., Mennella, T.A., Sawa, C., Berthelet, S., Krogan, N.J., Wolek, A., Podolny, V., Carpenter, L.R., Greenblatt, J.F., Baetz, K., *et al.* (2006b). The *Saccharomyces cerevisiae* histone H2A variant Htz1 is acetylated by NuA4. *Genes Dev* 20, 660-665.

Keskin, H., Shen, Y., Huang, F., Patel, M., Yang, T., Ashley, K., Mazin, A.V., and Storici, F. (2014). Transcript-RNA-templated DNA recombination and repair. *Nature* 515, 436-439.

Khurana, S., Kruhlak, M.J., Kim, J., Tran, A.D., Liu, J., Nyswaner, K., Shi, L., Jailwala, P., Sung, M.-H., Hakim, O., *et al.* (2014). A Macrohistone Variant Links Dynamic Chromatin Compaction to BRCA1-Dependent Genome Maintenance. *Cell Reports* 8, 1049-1062.

Kim, C.H., Kim, J.W., Jang, S.M., An, J.H., Seo, S.B., and Choi, K.H. (2015). The chromodomain-containing histone acetyltransferase TIP60 acts as a code reader, recognizing the epigenetic codes for initiating transcription. *Biosci Biotechnol Biochem* 79, 532-538.

Kim, G.W., and Yang, X.J. (2011). Comprehensive lysine acetylomes emerging from bacteria to humans. *Trends Biochem Sci* 36, 211-220.

Kim, H., and D'Andrea, A.D. (2012). Regulation of DNA cross-link repair by the Fanconi anemia/BRCA pathway. *Genes Dev* 26, 1393-1408.

Kim, J., Daniel, J., Espejo, A., Lake, A., Krishna, M., Xia, L., Zhang, Y., and Bedford, M.T. (2006). Tudor, MBT and chromo domains gauge the degree of lysine methylation. *EMBO Rep* 7, 397-403.

Kim, J., Woo, A.J., Chu, J., Snow, J.W., Fujiwara, Y., Kim, C.G., Cantor, A.B., and Orkin, S.H. (2010). A Myc network accounts for similarities between embryonic stem and cancer cell transcription programs. *Cell* 143, 313-324.

Kim, J.-A., and Haber, J.E. (2009). Chromatin assembly factors Asf1 and CAF-1 have overlapping roles in deactivating the DNA damage checkpoint when DNA repair is complete. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106, 1151-1156.

Kim, J.A., Kruhlak, M., Dotiwala, F., Nussenzweig, A., and Haber, J.E. (2007a). Heterochromatin is refractory to gamma-H2AX modification in yeast and mammals. *J Cell Biol* 178, 209-218.

Kim, J.H., Kim, B., Cai, L., Choi, H.J., Ohgi, K.A., Tran, C., Chen, C., Chung, C.H., Huber, O., Rose, D.W., *et al.* (2005). Transcriptional regulation of a metastasis suppressor gene by Tip60 and beta-catenin complexes. *Nature* 434, 921-926.

Kim, M.Y., Ann, E.J., Kim, J.Y., Mo, J.S., Park, J.H., Kim, S.Y., Seo, M.S., and Park, H.S. (2007b). Tip60 histone acetyltransferase acts as a negative regulator of Notch1 signaling by means of acetylation. *Mol Cell Biol* 27, 6506-6519.

Kirkwood, K.J., Ahmad, Y., Larance, M., and Lamond, A.I. (2013). Characterization of native protein complexes and protein isoform variation using size-fractionation-based quantitative proteomics. *Mol Cell Proteomics* 12, 3851-3873.

Klement, K., Luijsterburg, M.S., Pinder, J.B., Cena, C.S., Del Nero, V., Wintersinger, C.M., Dellaire, G., van Attikum, H., and Goodarzi, A.A. (2014). Opposing ISWI- and CHD-class chromatin remodeling activities orchestrate heterochromatic DNA repair. *J Cell Biol* 207, 717-733.

Klose, R.J., Yamane, K., Bae, Y., Zhang, D., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Wong, J., and Zhang, Y. (2006). The transcriptional repressor JHDM3A demethylates trimethyl histone H3 lysine 9 and lysine 36. *Nature* 442, 312-316.

Klymenko, T., Papp, B., Fischle, W., Kocher, T., Schelder, M., Fritsch, C., Wild, B., Wilm, M., and Muller, J. (2006). A Polycomb group protein complex with sequence-specific DNA-binding and selective methyl-lysine-binding activities. *Genes Dev* 20, 1110-1122.

Knutson, B.A., and Hahn, S. (2011). Domains of Tra1 important for activator recruitment and transcription coactivator functions of SAGA and NuA4 complexes. *Mol Cell Biol* 31, 818-831.

Koch, C.A., Agyei, R., Galicia, S., Metalnikov, P., O'Donnell, P., Starostine, A., Weinfeld, M., and Durocher, D. (2004). Xrcc4 physically links DNA end processing by polynucleotide kinase to DNA ligation by DNA ligase IV. *EMBO J* 23, 3874-3885.

Krietsch, J., Rouleau, M., Pic, E., Ethier, C., Dawson, T.M., Dawson, V.L., Masson, J.Y., Poirier, G.G., and Gagne, J.P. (2013). Reprogramming cellular events by poly(ADP-ribose)-binding proteins. *Mol Aspects Med* 34, 1066-1087.

Krishnakumar, R., Gamble, M.J., Frizzell, K.M., Berrocal, J.G., Kininis, M., and Kraus, W.L. (2008). Reciprocal binding of PARP-1 and histone H1 at promoters specifies transcriptional outcomes. *Science* 319, 819-821.

Krogan, N.J., Cagney, G., Yu, H., Zhong, G., Guo, X., Ignatchenko, A., Li, J., Pu, S., Datta, N., Tikuisis, A.P., *et al.* (2006). Global landscape of protein complexes in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature* 440, 637-643.

Krogan, N.J., Lippman, S., Agard, D.A., Ashworth, A., and Ideker, T. (2015). The Cancer Cell Map Initiative: Defining the Hallmark Networks of Cancer. *Mol Cell* 58, 690-698.

Kruhlak, M.J., Celeste, A., Dellaire, G., Fernandez-Capetillo, O., Muller, W.G., McNally, J.G., Bazett-Jones, D.P., and Nussenzweig, A. (2006). Changes in chromatin structure and mobility in living cells at sites of DNA double-strand breaks. *J Cell Biol* 172, 823-834.

Kumar, A., and Zhang, K.Y. (2015). Advances in the development of SUMO specific protease (SEN) inhibitors. *Comput Struct Biotechnol J* 13, 204-211.

Kumar, G.S., Chang, W., Xie, T., Patel, A., Zhang, Y., Wang, G.G., David, G., and Radhakrishnan, I. (2012). Sequence requirements for combinatorial recognition of histone H3 by the MRG15 and Pf1 subunits of the Rpd3S/Sin3S corepressor complex. *J Mol Biol* 422, 519-531.

Kuo, A.J., Cheung, P., Chen, K., Zee, B.M., Kioi, M., Lauring, J., Xi, Y., Park, B.H., Shi, X., Garcia, B.A., *et al.* (2011). NSD2 links dimethylation of histone H3 at lysine 36 to oncogenic programming. *Mol Cell* 44, 609-620.

Kusch, T., Florens, L., Macdonald, W.H., Swanson, S.K., Glaser, R.L., Yates, J.R., 3rd, Abmayr, S.M., Washburn, M.P., and Workman, J.L. (2004). Acetylation by Tip60 is required for selective histone variant exchange at DNA lesions. *Science* 306, 2084-2087.

Kusch, T., Mei, A., and Nguyen, C. (2014). Histone H3 lysine 4 trimethylation regulates cotranscriptional H2A variant exchange by Tip60 complexes to maximize gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111, 4850-4855.

Lacoste, N., Utley, R.T., Hunter, J.M., Poirier, G.G., and Cote, J. (2002). Disruptor of telomeric silencing-1 is a chromatin-specific histone H3 methyltransferase. *J Biol Chem* 277, 30421-30424.

Ladurner, A.G., Inouye, C., Jain, R., and Tjian, R. (2003). Bromodomains mediate an acetyl-histone encoded antisilencing function at heterochromatin boundaries. *Mol Cell* 11, 365-376.

Lalonde, M.E., Avvakumov, N., Glass, K.C., Joncas, F.H., Saksouk, N., Holliday, M., Paquet, E., Yan, K., Tong, Q., Klein, B.J., *et al.* (2013). Exchange of associated factors directs a switch in HBO1 acetyltransferase histone tail specificity. *Genes Dev* 27, 2009-2024.

Lalonde, M.E., Cheng, X., and Cote, J. (2014). Histone target selection within chromatin: an exemplary case of teamwork. *Genes Dev* 28, 1029-1041.

Lambert, J.P., Tucholska, M., Pawson, T., and Gingras, A.C. (2014). Incorporating DNA shearing in standard affinity purification allows simultaneous identification of both soluble and chromatin-bound interaction partners. *J Proteomics* 100, 55-59.

Langmead, B., Trapnell, C., Pop, M., and Salzberg, S.L. (2009). Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome. *Genome Biol* 10, R25.

Langst, G., and Manelyte, L. (2015). Chromatin Remodelers: From Function to Dysfunction. *Genes (Basel)* 6, 299-324.

Latrick, C.M., Marek, M., Ouarrhni, K., Papin, C., Stoll, I., Ignatyeva, M., Obri, A., Ennifar, E., Dimitrov, S., Romier, C., *et al.* (2016). Molecular basis and specificity of H2A.Z-H2B recognition and deposition by the histone chaperone YL1. *Nat Struct Mol Biol*.

Lawrence, M.S., Stojanov, P., Mermel, C.H., Robinson, J.T., Garraway, L.A., Golub, T.R., Meyerson, M., Gabriel, S.B., Lander, E.S., and Getz, G. (2014). Discovery and saturation analysis of cancer genes across 21 tumour types. *Nature* 505, 495-501.

Le Masson, I., Yu, D.Y., Jensen, K., Chevalier, A., Courbeyrette, R., Boulard, Y., Smith, M.M., and Mann, C. (2003). Yaf9, a novel NuA4 histone acetyltransferase subunit, is required for the cellular response to spindle stress in yeast. *Mol Cell Biol* 23, 6086-6102.

Lechtenberg, B.C., Allen, M.D., Rutherford, T.J., Freund, S.M., and Bycroft, M. (2009). Solution structure of the FCS zinc finger domain of the human polycomb group protein L(3)mbt-like 2. *Protein Sci* 18, 657-661.

Lee, D.H., Acharya, S.S., Kwon, M., Drane, P., Guan, Y., Adelmant, G., Kalev, P., Shah, J., Pellman, D., Marto, J.A., *et al.* (2014). Dephosphorylation enables the recruitment of 53BP1 to double-strand DNA breaks. *Mol Cell* 54, 512-525.

Lee, H.J., Chun, M., and Kandror, K.V. (2001). Tip60 and HDAC7 interact with the endothelin receptor a and may be involved in downstream signaling. *J Biol Chem* 276, 16597-16600.

Lee, H.S., Park, J.H., Kim, S.J., Kwon, S.J., and Kwon, J. (2010). A cooperative activation loop among SWI/SNF, gamma-H2AX and H3 acetylation for DNA double-strand break repair. *EMBO J* 29, 1434-1445.

Legube, G., Linares, L.K., Lemerrier, C., Scheffner, M., Khochbin, S., and Trouche, D. (2002). Tip60 is targeted to proteasome-mediated degradation by Mdm2 and accumulates after UV irradiation. *EMBO J* 21, 1704-1712.

Legube, G., Linares, L.K., Tyteca, S., Caron, C., Scheffner, M., Chevillard-Briet, M., and Trouche, D. (2004). Role of the histone acetyl transferase Tip60 in the p53 pathway. *J Biol Chem* 279, 44825-44833.

Legube, G., and Trouche, D. (2003). Identification of a larger form of the histone acetyl transferase Tip60. *Gene* 310, 161-168.

Leiserson, M.D., Vandin, F., Wu, H.T., Dobson, J.R., Eldridge, J.V., Thomas, J.L., Papoutsaki, A., Kim, Y., Niu, B., McLellan, M., *et al.* (2015). Pan-cancer network analysis identifies combinations of rare somatic mutations across pathways and protein complexes. *Nature genetics* 47, 106-114.

Lemerrier, C., Legube, G., Caron, C., Louwagie, M., Garin, J., Trouche, D., and Khochbin, S. (2003). Tip60 acetyltransferase activity is controlled by phosphorylation. *J Biol Chem* 278, 4713-4718.

Leung, J.W., Agarwal, P., Canny, M.D., Gong, F., Robison, A.D., Finkelstein, I.J., Durocher, D., and Miller, K.M. (2014). Nucleosome acidic patch promotes RNF168- and RING1B/BMI1-dependent H2AX and H2A ubiquitination and DNA damage signaling. *PLoS Genet* 10, e1004178.

Li, B., Gogol, M., Carey, M., Pattenden, S.G., Seidel, C., and Workman, J.L. (2007). Infrequently transcribed long genes depend on the Set2/Rpd3S pathway for accurate transcription. *Genes Dev* 21, 1422-1430.

Li, F., Parry, D.A., and Scott, M.J. (2005). The amino-terminal region of Drosophila MSL1 contains basic, glycine-rich, and leucine zipper-like motifs that promote X chromosome binding, self-association, and MSL2 binding, respectively. *Mol Cell Biol* 25, 8913-8924.

Li, H., Cuenin, C., Murr, R., Wang, Z.Q., and Herceg, Z. (2004). HAT cofactor Trp regulates the mitotic checkpoint by modulation of Mad1 and Mad2 expression. *EMBO J* 23, 4824-4834.

Li, H., Handsaker, B., Wysoker, A., Fennell, T., Ruan, J., Homer, N., Marth, G., Abecasis, G., Durbin, R., and Genome Project Data Processing, S. (2009a). The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics* 25, 2078-2079.

Li, M., and Yu, X. (2013). Function of BRCA1 in the DNA damage response is mediated by ADP-ribosylation. *Cancer Cell* 23, 693-704.

Li, X., Wu, L., Corsa, C.A., Kunkel, S., and Dou, Y. (2009b). Two mammalian MOF complexes regulate transcription activation by distinct mechanisms. *Mol Cell* 36, 290-301.

Li, Y., Wen, H., Xi, Y., Tanaka, K., Wang, H., Peng, D., Ren, Y., Jin, Q., Dent, S.Y., Li, W., *et al.* (2014). AF9 YEATS domain links histone acetylation to DOT1L-mediated H3K79 methylation. *Cell* 159, 558-571.

Lin, S.Y., Li, T.Y., Liu, Q., Zhang, C., Li, X., Chen, Y., Zhang, S.M., Lian, G., Ruan, K., Wang, Z., *et al.* (2012). GSK3-TIP60-ULK1 signaling pathway links growth factor deprivation to autophagy. *Science* 336, 477-481.

Lin, Y.Y., Lu, J.Y., Zhang, J., Walter, W., Dang, W., Wan, J., Tao, S.C., Qian, J., Zhao, Y., Boeke, J.D., *et al.* (2009). Protein acetylation microarray reveals that NuA4 controls key metabolic target regulating gluconeogenesis. *Cell* 136, 1073-1084.

Liu, C., Srihari, S., Cao, K.A., Chenevix-Trench, G., Simpson, P.T., Ragan, M.A., and Khanna, K.K. (2014). A fine-scale dissection of the DNA double-strand break repair machinery and its implications for breast cancer therapy. *Nucleic Acids Res* 42, 6106-6127.

Liu, G., Zhang, J., Larsen, B., Stark, C., Breitkreutz, A., Lin, Z.Y., Breitkreutz, B.J., Ding, Y., Colwill, K., Pasculescu, A., *et al.* (2010). ProHits: integrated software for mass spectrometry-based interaction proteomics. *Nat Biotechnol* 28, 1015-1017.

Liu, S., Opiyo, S.O., Manthey, K., Glanzer, J.G., Ashley, A.K., Amerin, C., Troksa, K., Shrivastav, M., Nickoloff, J.A., and Oakley, G.G. (2012). Distinct roles for DNA-PK, ATM and ATR in RPA phosphorylation and checkpoint activation in response to replication stress. *Nucleic Acids Res* 40, 10780-10794.

Liu, Y., Masson, J.Y., Shah, R., O'Regan, P., and West, S.C. (2004). RAD51C is required for Holliday junction processing in mammalian cells. *Science* 303, 243-246.

Lombardo, A., Cesana, D., Genovese, P., Di Stefano, B., Provasi, E., Colombo, D.F., Neri, M., Magnani, Z., Cantore, A., Lo Riso, P., *et al.* (2011). Site-specific integration and tailoring of cassette design for sustainable gene transfer. *Nature methods* 8, 861-869.

Lottersberger, F., Bothmer, A., Robbiani, D.F., Nussenzweig, M.C., and de Lange, T. (2013). Role of 53BP1 oligomerization in regulating double-strand break repair. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110, 2146-2151.

Luco, R.F., Pan, Q., Tominaga, K., Blencowe, B.J., Pereira-Smith, O.M., and Misteli, T. (2010). Regulation of alternative splicing by histone modifications. *Science* 327, 996-1000.

Luk, E., Vu, N.D., Patteson, K., Mizuguchi, G., Wu, W.H., Ranjan, A., Backus, J., Sen, S., Lewis, M., Bai, Y., *et al.* (2007). Chz1, a nuclear chaperone for histone H2AZ. *Mol Cell* 25, 357-368.

Lukas, J., Lukas, C., and Bartek, J. (2011). More than just a focus: The chromatin response to DNA damage and its role in genome integrity maintenance. *Nat Cell Biol* 13, 1161-1169.

Luo, J., Shah, S., Riabowol, K., and Mains, P.E. (2009). The *Caenorhabditis elegans* *ing-3* gene regulates ionizing radiation-induced germ-cell apoptosis in a p53-associated pathway. *Genetics* 181, 473-482.

Lutzmann, M., Grey, C., Traver, S., Ganier, O., Maya-Mendoza, A., Ranisavljevic, N., Bernex, F., Nishiyama, A., Montel, N., Gavois, E., *et al.* (2012). MCM8- and MCM9-deficient mice reveal gametogenesis defects and genome instability due to impaired homologous recombination. *Mol Cell* 47, 523-534.

Ma, T., Chen, Y., Zhang, F., Yang, C.Y., Wang, S., and Yu, X. (2013). RNF111-dependent neddylation activates DNA damage-induced ubiquitination. *Mol Cell* 49, 897-907.

Macurek, L., Lindqvist, A., Voets, O., Kool, J., Vos, H.R., and Medema, R.H. (2010). Wip1 phosphatase is associated with chromatin and dephosphorylates gammaH2AX to promote checkpoint inhibition. *Oncogene* 29, 2281-2291.

Maiorano, D., Lutzmann, M., and Mechali, M. (2006). MCM proteins and DNA replication. *Curr Opin Cell Biol* 18, 130-136.

Makde, R.D., England, J.R., Yennawar, H.P., and Tan, S. (2010). Structure of RCC1 chromatin factor bound to the nucleosome core particle. *Nature* 467, 562-566.

Mali, P., Yang, L., Esvelt, K.M., Aach, J., Guell, M., DiCarlo, J.E., Norville, J.E., and Church, G.M. (2013). RNA-guided human genome engineering via Cas9. *Science* 339, 823-826.

Mallete, F.A., Mattioli, F., Cui, G., Young, L.C., Hendzel, M.J., Mer, G., Sixma, T.K., and Richard, S. (2012). RNF8- and RNF168-dependent degradation of KDM4A/JMJD2A triggers 53BP1 recruitment to DNA damage sites. *EMBO J* 31, 1865-1878.

Mao, Z., Pan, L., Wang, W., Sun, J., Shan, S., Dong, Q., Liang, X., Dai, L., Ding, X., Chen, S., *et al.* (2014). Anp32e, a higher eukaryotic histone chaperone directs preferential recognition for H2A.Z. *Cell Res* 24, 389-399.

Marcon, E., Ni, Z., Pu, S., Turinsky, A.L., Trimble, S.S., Olsen, J.B., Silverman-Gavrila, R., Silverman-Gavrila, L., Phanse, S., Guo, H., *et al.* (2014). Human-chromatin-related protein interactions identify a demethylase complex required for chromosome segregation. *Cell reports* 8, 297-310.

Margueron, R., and Reinberg, D. (2011). The Polycomb complex PRC2 and its mark in life. *Nature* 469, 343-349.

Marmorstein, R. (2001). Structure of histone acetyltransferases. *J Mol Biol* 311, 433-444.

Marmorstein, R., and Trievel, R.C. (2009). Histone modifying enzymes: structures, mechanisms, and specificities. *Biochim Biophys Acta* 1789, 58-68.

Martin, M., Kettmann, R., and Dequiedt, F. (2007). Class IIa histone deacetylases: regulating the regulators. *Oncogene* 26, 5450-5467.

Masson, J.Y., Tarsounas, M.C., Stasiak, A.Z., Stasiak, A., Shah, R., McIlwraith, M.J., Benson, F.E., and West, S.C. (2001). Identification and purification of two distinct complexes containing the five RAD51 paralogs. *Genes Dev* 15, 3296-3307.

Matangkasombut, O., Buratowski, R.M., Swilling, N.W., and Buratowski, S. (2000). Bromodomain factor 1 corresponds to a missing piece of yeast TFIIID. *Genes Dev* 14, 951-962.

Mattera, L., Courilleau, C., Legube, G., Ueda, T., Fukunaga, R., Chevillard-Briet, M., Canitrot, Y., Escaffit, F., and Trouche, D. (2010). The E1A-associated p400 protein modulates cell fate decisions by the regulation of ROS homeostasis. *PLoS Genet* 6, e1000983.

Mattioli, F., D'Arcy, S., and Luger, K. (2015). The right place at the right time: chaperoning core histone variants. *EMBO Rep* 16, 1454-1466.

Mattioli, F., and Sixma, T.K. (2014). Lysine-targeting specificity in ubiquitin and ubiquitin-like modification pathways. *Nat Struct Mol Biol* 21, 308-316.

Mattioli, F., Uckelmann, M., Sahtoe, D.D., van Dijk, W.J., and Sixma, T.K. (2014). The nucleosome acidic patch plays a critical role in RNF168-dependent ubiquitination of histone H2A. *Nat Commun* 5, 3291.

Mattioli, F., Vissers, J.H., van Dijk, W.J., Ikpa, P., Citterio, E., Vermeulen, W., Marteijn, J.A., and Sixma, T.K. (2012). RNF168 ubiquitinates K13-15 on H2A/H2AX to drive DNA damage signaling. *Cell* 150, 1182-1195.

Maurer-Stroh, S., Dickens, N.J., Hughes-Davies, L., Kouzarides, T., Eisenhaber, F., and Ponting, C.P. (2003). The Tudor domain 'Royal Family': Tudor, plant Agenet, Chromo, PWWP and MBT domains. *Trends Biochem Sci* 28, 69-74.

Maze, I., Noh, K.M., Soshnev, A.A., and Allis, C.D. (2014). Every amino acid matters: essential contributions of histone variants to mammalian development and disease. *Nat Rev Genet* 15, 259-271.

McGaughran, J. (2003). Klippel-Feil anomaly in Fanconi anemia. *Clin Dysmorphol* 12, 197.

McGaughran, J.M., Oates, A., Donnai, D., Read, A.P., and Tassabehji, M. (2003). Mutations in PAX1 may be associated with Klippel-Feil syndrome. *Eur J Hum Genet* 11, 468-474.

McMahon, S.B., Van Buskirk, H.A., Dugan, K.A., Copeland, T.D., and Cole, M.D. (1998). The novel ATM-related protein TRRAP is an essential cofactor for the c-Myc and E2F oncoproteins. *Cell* 94, 363-374.

Meas, R., Smerdon, M.J., and Wyrick, J.J. (2015). The amino-terminal tails of histones H2A and H3 coordinate efficient base excision repair, DNA damage signaling and postreplication repair in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res* 43, 4990-5001.

Mehrotra, P.V., Ahel, D., Ryan, D.P., Weston, R., Wiechens, N., Kraehenbuehl, R., Owen-Hughes, T., and Ahel, I. (2011). DNA repair factor APLF is a histone chaperone. *Mol Cell* 41, 46-55.

Mendjan, S., Taipale, M., Kind, J., Holz, H., Gebhardt, P., Schelder, M., Vermeulen, M., Buscaino, A., Duncan, K., Mueller, J., *et al.* (2006). Nuclear pore components are involved in the transcriptional regulation of dosage compensation in *Drosophila*. *Mol Cell* 21, 811-823.

Micci, F., Panagopoulos, I., Bjerkehagen, B., and Heim, S. (2006). Consistent rearrangement of chromosomal band 6p21 with generation of fusion genes JAZF1/PHF1 and EPC1/PHF1 in endometrial stromal sarcoma. *Cancer Res* 66, 107-112.

Miller, K.M., Tjeertes, J.V., Coates, J., Legube, G., Polo, S.E., Britton, S., and Jackson, S.P. (2010). Human HDAC1 and HDAC2 function in the DNA-damage response to promote DNA nonhomologous end-joining. *Nat Struct Mol Biol* 17, 1144-1151.

Mitchell, L., Lau, A., Lambert, J.P., Zhou, H., Fong, Y., Couture, J.F., Figeys, D., and Baetz, K. (2011). Regulation of septin dynamics by the *Saccharomyces cerevisiae* lysine acetyltransferase NuA4. *PLoS One* 6, e25336.

Monroy, M.A., Ruhl, D.D., Xu, X., Granner, D.K., Yaciuk, P., and Chrivia, J.C. (2001). Regulation of cAMP-responsive element-binding protein-mediated transcription by the SNF2/SWI-related protein, SRCAP. *J Biol Chem* 276, 40721-40726.

Morris, J.R., Boutell, C., Keppler, M., Densham, R., Weekes, D., Alamshah, A., Butler, L., Galanty, Y., Pangon, L., Kiuchi, T., *et al.* (2009). The SUMO modification pathway is involved in the BRCA1 response to genotoxic stress. *Nature* 462, 886-890.

Morrison, A.J., Highland, J., Krogan, N.J., Arbel-Eden, A., Greenblatt, J.F., Haber, J.E., and Shen, X. (2004). INO80 and gamma-H2AX interaction links ATP-dependent chromatin remodeling to DNA damage repair. *Cell* 119, 767-775.

Motycka, T.A., Bessho, T., Post, S.M., Sung, P., and Tomkinson, A.E. (2004). Physical and functional interaction between the XPF/ERCC1 endonuclease and hRad52. *J Biol Chem* 279, 13634-13639.

Moyal, L., Lerenthal, Y., Gana-Weisz, M., Mass, G., So, S., Wang, S.Y., Eppink, B., Chung, Y.M., Shalev, G., Shema, E., *et al.* (2011). Requirement of ATM-dependent monoubiquitylation of histone H2B for timely repair of DNA double-strand breaks. *Mol Cell* 41, 529-542.

Mozzetta, C., Pontis, J., Fritsch, L., Robin, P., Portoso, M., Proux, C., Margueron, R., and Ait-Si-Ali, S. (2014). The histone H3 lysine 9 methyltransferases G9a and GLP regulate polycomb repressive complex 2-mediated gene silencing. *Mol Cell* 53, 277-289.

Muckova, K., Duffield, J.S., Held, K.D., Bonventre, J.V., and Sheridan, A.M. (2006). cPLA2-interacting protein, PLIP, causes apoptosis and decreases G1 phase in mesangial cells. *Am J Physiol Renal Physiol* 290, F70-79.

Mulder, K.W., Wang, X., Escriu, C., Ito, Y., Schwarz, R.F., Gillis, J., Sirokmany, G., Donati, G., Uribe-Lewis, S., Pavlidis, P., *et al.* (2012). Diverse epigenetic strategies interact to control epidermal differentiation. *Nat Cell Biol* 14, 753-763.

Muller, S., Filippakopoulos, P., and Knapp, S. (2011). Bromodomains as therapeutic targets. *Expert Rev Mol Med* 13, e29.

Murawska, M., and Brehm, A. (2011). CHD chromatin remodelers and the transcription cycle. *Transcription* 2, 244-253.

Murr, R., Loizou, J.I., Yang, Y.G., Cuenin, C., Li, H., Wang, Z.Q., and Herceg, Z. (2006). Histone acetylation by Trrap-Tip60 modulates loading of repair proteins and repair of DNA double-strand breaks. *Nat Cell Biol* 8, 91-99.

Musselman, C.A., Avvakumov, N., Watanabe, R., Abraham, C.G., Lalonde, M.E., Hong, Z., Allen, C., Roy, S., Nunez, J.K., Nickoloff, J., *et al.* (2012a). Molecular basis for H3K36me3 recognition by the Tudor domain of PHF1. *Nat Struct Mol Biol* 19, 1266-1272.

Musselman, C.A., and Kutateladze, T.G. (2011). Methyl fingerprinting of the nucleosome reveals the molecular mechanism of high-mobility group nucleosomal-2 (HMGN2) association. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, 12189-12190.

Musselman, C.A., Lalonde, M.E., Cote, J., and Kutateladze, T.G. (2012b). Perceiving the epigenetic landscape through histone readers. *Nat Struct Mol Biol* 19, 1218-1227.

Nady, N., Krichevsky, L., Zhong, N., Duan, S., Tempel, W., Amaya, M.F., Ravichandran, M., and Arrowsmith, C.H. (2012). Histone recognition by human malignant brain tumor domains. *J Mol Biol* 423, 702-718.

Nagashima, M., Shiseki, M., Pedoux, R.M., Okamura, S., Kitahama-Shiseki, M., Miura, K., Yokota, J., and Harris, C.C. (2003). A novel PHD-finger motif protein, p47ING3, modulates p53-mediated transcription, cell cycle control, and apoptosis. *Oncogene* 22, 343-350.

Nakada, S., Chen, G.I., Gingras, A.C., and Durocher, D. (2008). PP4 is a gamma H2AX phosphatase required for recovery from the DNA damage checkpoint. *EMBO Rep* 9, 1019-1026.

Nakada, S., Tai, I., Panier, S., Al-Hakim, A., Iemura, S., Juang, Y.C., O'Donnell, L., Kumakubo, A., Munro, M., Sicheri, F., *et al.* (2010). Non-canonical inhibition of DNA damage-dependent ubiquitination by OTUB1. *Nature* 466, 941-946.

Nakahata, S., Saito, Y., Hamasaki, M., Hidaka, T., Arai, Y., Taki, T., Taniwaki, M., and Morishita, K. (2009). Alteration of enhancer of polycomb 1 at 10p11.2 is one of the genetic events leading to development of adult T-cell leukemia/lymphoma. *Genes Chromosomes Cancer* 48, 768-776.

Nakamura, K., Kato, A., Kobayashi, J., Yanagihara, H., Sakamoto, S., Oliveira, D.V., Shimada, M., Tauchi, H., Suzuki, H., Tashiro, S., *et al.* (2011). Regulation of homologous recombination by RNF20-dependent H2B ubiquitination. *Mol Cell* 41, 515-528.

Nasmyth, K., and Haering, C.H. (2009). Cohesin: its roles and mechanisms. *Annu Rev Genet* 43, 525-558.

Nathan, D., Ingvarsdottir, K., Sterner, D.E., Bylebyl, G.R., Dokmanovic, M., Dorsey, J.A., Whelan, K.A., Krsmanovic, M., Lane, W.S., Meluh, P.B., *et al.* (2006). Histone sumoylation is a negative regulator in *Saccharomyces cerevisiae* and shows dynamic interplay with positive-acting histone modifications. *Genes Dev* 20, 966-976.

Nathan, D., Sterner, D.E., and Berger, S.L. (2003). Histone modifications: Now summoning sumoylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 13118-13120.

Negishi, M., Chiba, T., Saraya, A., Miyagi, S., and Iwama, A. (2009). Dmap1 plays an essential role in the maintenance of genome integrity through the DNA repair process. *Genes Cells* 14, 1347-1357.

Neumann, H., Hancock, S.M., Buning, R., Routh, A., Chapman, L., Somers, J., Owen-Hughes, T., van Noort, J., Rhodes, D., and Chin, J.W. (2009). A Method for Genetically Installing Site-Specific Acetylation in Recombinant Histones Defines the Effects of H3 K56 Acetylation. *Molecular Cell* 36, 153-163.

Ng, H.H., Feng, Q., Wang, H., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Zhang, Y., and Struhl, K. (2002). Lysine methylation within the globular domain of histone H3 by Dot1 is important for telomeric silencing and Sir protein association. *Genes Dev* 16, 1518-1527.

Nishi, R., Wijnhoven, P., le Sage, C., Tjeertes, J., Galanty, Y., Forment, J.V., Clague, M.J., Urbe, S., and Jackson, S.P. (2014). Systematic characterization of deubiquitylating enzymes for roles in maintaining genome integrity. *Nat Cell Biol* 16, 1016-1026, 1011-1018.

Nishimura, K., Ishiai, M., Horikawa, K., Fukagawa, T., Takata, M., Takisawa, H., and Kanemaki, M.T. (2012). Mcm8 and Mcm9 form a complex that functions in homologous recombination repair induced by DNA interstrand crosslinks. *Mol Cell* 47, 511-522.

Nishioka, K., Rice, J.C., Sarma, K., Erdjument-Bromage, H., Werner, J., Wang, Y., Chuikov, S., Valenzuela, P., Tempst, P., Steward, R., *et al.* (2002). PR-Set7 is a nucleosome-specific methyltransferase that modifies lysine 20 of histone H4 and is associated with silent chromatin. *Mol Cell* 9, 1201-1213.

Nowak, S.J., and Corces, V.G. (2004). Phosphorylation of histone H3: a balancing act between chromosome condensation and transcriptional activation. *Trends Genet* 20, 214-220.

Oberoi, J., Richards, M.W., Crumpler, S., Brown, N., Blagg, J., and Bayliss, R. (2010). Structural basis of poly(ADP-ribose) recognition by the multizinc binding domain of checkpoint with forkhead-associated and RING Domains (CHFR). *J Biol Chem* 285, 39348-39358.

Obri, A., Ouarrhni, K., Papin, C., Diebold, M.L., Padmanabhan, K., Marek, M., Stoll, I., Roy, L., Reilly, P.T., Mak, T.W., *et al.* (2014). ANP32E is a histone chaperone that removes H2A.Z from chromatin. *Nature* 505, 648-653.

Ochi, T., Blackford, A.N., Coates, J., Jhujh, S., Mehmood, S., Tamura, N., Travers, J., Wu, Q., Draviam, V.M., Robinson, C.V., *et al.* (2015). DNA repair. PAXX, a paralog of XRCC4 and XLF, interacts with Ku to promote DNA double-strand break repair. *Science* 347, 185-188.

Ochi, T., Sibanda, B.L., Wu, Q., Chirgadze, D.Y., Bolanos-Garcia, V.M., and Blundell, T.L. (2010). Structural biology of DNA repair: spatial organisation of the multicomponent complexes of nonhomologous end joining. *J Nucleic Acids* 2010.

Ogiwara, H., Ui, A., Otsuka, A., Satoh, H., Yokomi, I., Nakajima, S., Yasui, A., Yokota, J., and Kohno, T. (2011). Histone acetylation by CBP and p300 at double-strand break sites facilitates SWI/SNF chromatin remodeling and the recruitment of non-homologous end joining factors. *Oncogene* 30, 2135-2146.

Ohba, R., Steger, D.J., Brownell, J.E., Mizzen, C.A., Cook, R.G., Cote, J., Workman, J.L., and Allis, C.D. (1999). A novel H2A/H4 nucleosomal histone acetyltransferase in *Tetrahymena thermophila*. *Mol Cell Biol* 19, 2061-2068.

Oka, Y., Suzuki, K., Yamauchi, M., Mitsutake, N., and Yamashita, S. (2011). Recruitment of the cohesin loading factor NIPBL to DNA double-strand breaks depends on MDC1, RNF168 and HP1gamma in human cells. *Biochem Biophys Res Commun* 411, 762-767.

Ortega-Aienza, S., Wong, V.C., DeLoughery, Z., Luczak, M.W., and Zhitkovich, A. (2016). ATM and KAT5 safeguard replicating chromatin against formaldehyde damage. *Nucleic Acids Res* 44, 198-209.

Orthwein, A., Fradet-Turcotte, A., Noordermeer, S.M., Canny, M.D., Brun, C.M., Strecker, J., Escribano-Diaz, C., and Durocher, D. (2014). Mitosis inhibits DNA double-strand break repair to guard against telomere fusions. *Science* 344, 189-193.

Orthwein, A., Noordermeer, S.M., Wilson, M.D., Landry, S., Enchev, R.I., Sherker, A., Munro, M., Pinder, J., Salsman, J., Dellaire, G., *et al.* (2015). A mechanism for the suppression of homologous recombination in G1 cells. *Nature* 528, 422-426.

Panier, S., and Boulton, S.J. (2014). Double-strand break repair: 53BP1 comes into focus. *Nat Rev Mol Cell Biol* 15, 7-18.

Panier, S., and Durocher, D. (2013). Push back to respond better: regulatory inhibition of the DNA double-strand break response. *Nat Rev Mol Cell Biol* 14, 661-672.

Panier, S., Ichijima, Y., Fradet-Turcotte, A., Leung, C.C., Kaustov, L., Arrowsmith, C.H., and Durocher, D. (2012). Tandem protein interaction modules organize the ubiquitin-dependent response to DNA double-strand breaks. *Mol Cell* 47, 383-395.

Pankotai, T., Bonhomme, C., Chen, D., and Soutoglou, E. (2012). DNAPKcs-dependent arrest of RNA polymerase II transcription in the presence of DNA breaks. *Nat Struct Mol Biol* 19, 276-282.

Papamichos-Chronakis, M., Krebs, J.E., and Peterson, C.L. (2006). Interplay between Ino80 and Swr1 chromatin remodeling enzymes regulates cell cycle checkpoint adaptation in response to DNA damage. *Genes Dev* 20, 2437-2449.

Papamichos-Chronakis, M., and Peterson, C.L. (2008). The Ino80 chromatin-remodeling enzyme regulates replisome function and stability. *Nat Struct Mol Biol* 15, 338-345.

Pardo, P.S., Leung, J.K., Lucchesi, J.C., and Pereira-Smith, O.M. (2002). MRG15, a novel chromodomain protein, is present in two distinct multiprotein complexes involved in transcriptional activation. *J Biol Chem* 277, 50860-50866.

Park, J., Kunjibettu, S., McMahon, S.B., and Cole, M.D. (2001). The ATM-related domain of TRRAP is required for histone acetyltransferase recruitment and Myc-dependent oncogenesis. *Genes Dev* 15, 1619-1624.

Park, J., Long, D.T., Lee, K.Y., Abbas, T., Shibata, E., Negishi, M., Luo, Y., Schimenti, J.C., Gambus, A., Walter, J.C., *et al.* (2013). The MCM8-MCM9 complex promotes RAD51 recruitment at DNA damage sites to facilitate homologous recombination. *Mol Cell Biol* 33, 1632-1644.

Park, J.H., Park, E.J., Hur, S.K., Kim, S., and Kwon, J. (2009). Mammalian SWI/SNF chromatin remodeling complexes are required to prevent apoptosis after DNA damage. *DNA Repair (Amst)* 8, 29-39.

Park, J.H., Sun, X.J., and Roeder, R.G. (2010). The SANT domain of p400 ATPase represses acetyltransferase activity and coactivator function of TIP60 in basal p21 gene expression. *Mol Cell Biol* 30, 2750-2761.

Patel, J.H., Du, Y., Ard, P.G., Phillips, C., Carella, B., Chen, C.J., Rakowski, C., Chatterjee, C., Lieberman, P.M., Lane, W.S., *et al.* (2004). The c-MYC oncoprotein is a substrate of the acetyltransferases hGCN5/PCAF and TIP60. *Mol Cell Biol* 24, 10826-10834.

Pei, H., Wu, X., Liu, T., Yu, K., Jelinek, D.F., and Lou, Z. (2013). The histone methyltransferase MMSET regulates class switch recombination. *J Immunol* 190, 756-763.

Pei, H., Zhang, L., Luo, K., Qin, Y., Chesi, M., Fei, F., Bergsagel, P.L., Wang, L., You, Z., and Lou, Z. (2011). MMSET regulates histone H4K20 methylation and 53BP1 accumulation at DNA damage sites. *Nature* 470, 124-128.

Peng, L., Ling, H., Yuan, Z., Fang, B., Bloom, G., Fukasawa, K., Koomen, J., Chen, J., Lane, W.S., and Seto, E. (2012). SIRT1 negatively regulates the activities, functions, and protein levels of hMOF and TIP60. *Mol Cell Biol* 32, 2823-2836.

Penicud, K., and Behrens, A. (2014). DMAP1 is an essential regulator of ATM activity and function. *Oncogene* 33, 525-531.

Pesavento, J.J., Bullock, C.R., LeDuc, R.D., Mizzen, C.A., and Kelleher, N.L. (2008a). Combinatorial modification of human histone H4 quantitated by two-dimensional liquid chromatography coupled with top down mass spectrometry. *J Biol Chem* 283, 14927-14937.

Pesavento, J.J., Yang, H., Kelleher, N.L., and Mizzen, C.A. (2008b). Certain and progressive methylation of histone H4 at lysine 20 during the cell cycle. *Mol Cell Biol* 28, 468-486.

Pfister, S.X., Ahrabi, S., Zalmas, L.P., Sarkar, S., Aymard, F., Bachrati, C.Z., Helleday, T., Legube, G., La Thangue, N.B., Porter, A.C., *et al.* (2014). SETD2-dependent histone H3K36 trimethylation is required for homologous recombination repair and genome stability. *Cell Rep* 7, 2006-2018.

Pierce, A.J., Johnson, R.D., Thompson, L.H., and Jasin, M. (1999). XRCC3 promotes homology-directed repair of DNA damage in mammalian cells. *Genes Dev* 13, 2633-2638.

Pinato, S., Gatti, M., Scanduzzi, C., Confalonieri, S., and Penengo, L. (2011). UMI, a novel RNF168 ubiquitin binding domain involved in the DNA damage signaling pathway. *Mol Cell Biol* 31, 118-126.

Plass, C., Pfister, S.M., Lindroth, A.M., Bogatyrova, O., Claus, R., and Lichter, P. (2013). Mutations in regulators of the epigenome and their connections to global chromatin patterns in cancer. *Nature reviews. Genetics* 14, 765-780.

Polo, S.E., and Jackson, S.P. (2011). Dynamics of DNA damage response proteins at DNA breaks: a focus on protein modifications. *Genes Dev* 25, 409-433.

Polo, S.E., Kaidi, A., Baskcomb, L., Galanty, Y., and Jackson, S.P. (2010). Regulation of DNA-damage responses and cell-cycle progression by the chromatin remodelling factor CHD4. *EMBO J* 29, 3130-3139.

Polo, S.E., Roche, D.I., and Almouzni, G.v. (2006). New Histone Incorporation Marks Sites of UV Repair in Human Cells. *Cell* 127, 481-493.

Potts, P.R., Porteus, M.H., and Yu, H. (2006). Human SMC5/6 complex promotes sister chromatid homologous recombination by recruiting the SMC1/3 cohesin complex to double-strand breaks. *EMBO J* 25, 3377-3388.

Putnam, C.D., Clancy, S.B., Tsuruta, H., Gonzalez, S., Wetmur, J.G., and Tainer, J.A. (2001). Structure and mechanism of the RuvB Holliday junction branch migration motor. *J Mol Biol* 311, 297-310.

Quinlan, A.R., and Hall, I.M. (2010). BEDTools: a flexible suite of utilities for comparing genomic features. *Bioinformatics* 26, 841-842.

Rai, R., Zheng, H., He, H., Luo, Y., Multani, A., Carpenter, P.B., and Chang, S. (2010). The function of classical and alternative non-homologous end-joining pathways in the fusion of dysfunctional telomeres. *EMBO J* 29, 2598-2610.

Rajendra, E., Oestergaard, V.H., Langevin, F., Wang, M., Dornan, G.L., Patel, K.J., and Passmore, L.A. (2014). The genetic and biochemical basis of FANCD2 monoubiquitination. *Mol Cell* 54, 858-869.

Ran, F.A., Hsu, P.D., Lin, C.Y., Gootenberg, J.S., Konermann, S., Trevino, A.E., Scott, D.A., Inoue, A., Matoba, S., Zhang, Y., *et al.* (2013). Double nicking by RNA-guided CRISPR Cas9 for enhanced genome editing specificity. *Cell* 154, 1380-1389.

Ranjan, A., Wang, F., Mizuguchi, G., Wei, D., Huang, Y., and Wu, C. (2015). H2A histone-fold and DNA elements in nucleosome activate SWR1-mediated H2A.Z replacement in budding yeast. *Elife* 4, e06845.

Ravens, S., Yu, C., Ye, T., Stierle, M., and Tora, L. (2015). Tip60 complex binds to active Pol II promoters and a subset of enhancers and co-regulates the c-Myc network in mouse embryonic stem cells. *Epigenetics Chromatin* 8, 45.

Raynard, S., Bussen, W., and Sung, P. (2006). A double Holliday junction dissolvosome comprising BLM, topoisomerase IIIalpha, and BLAP75. *J Biol Chem* 281, 13861-13864.

Redon, C., Pilch, D., Rogakou, E., Sedelnikova, O., Newrock, K., and Bonner, W. (2002). Histone H2A variants H2AX and H2AZ. *Curr Opin Genet Dev* 12, 162-169.

Renaud, E., Barascu, A., and Rosselli, F. (2016). Impaired TIP60-mediated H4K16 acetylation accounts for the aberrant chromatin accumulation of 53BP1 and RAP80 in Fanconi anemia pathway-deficient cells. *Nucleic Acids Res* 44, 648-656.

Reyon, D., Tsai, S.Q., Khayter, C., Foden, J.A., Sander, J.D., and Joung, J.K. (2012). FLASH assembly of TALENs for high-throughput genome editing. *Nature biotechnology* 30, 460-465.

Rigaut, G., Shevchenko, A., Rutz, B., Wilm, M., Mann, M., and Seraphin, B. (1999). A generic protein purification method for protein complex characterization and proteome exploration. *Nature biotechnology* 17, 1030-1032.

Robert, F., Hardy, S., Nagy, Z., Baldeyron, C., Murr, R., Dery, U., Masson, J.Y., Papadopoulo, D., Herceg, Z., and Tora, L. (2006). The transcriptional histone acetyltransferase cofactor TRRAP associates with the MRN repair complex and plays a role in DNA double-strand break repair. *Mol Cell Biol* 26, 402-412.

Robert, T., Vanoli, F., Chiolo, I., Shubassi, G., Bernstein, K.A., Rothstein, R., Botrugno, O.A., Parazzoli, D., Oldani, A., Minucci, S., *et al.* (2011). HDACs link the DNA damage response, processing of double-strand breaks and autophagy. *Nature* 471, 74-79.

Rodrigue, A., Coulombe, Y., Jacquet, K., Gagne, J.P., Roques, C., Gobeil, S., Poirier, G., and Masson, J.Y. (2013). The RAD51 paralogs ensure cellular protection against mitotic defects and aneuploidy. *J Cell Sci* 126, 348-359.

Rodriguez-Paredes, M., and Esteller, M. (2011). Cancer epigenetics reaches mainstream oncology. *Nat Med* 17, 330-339.

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.

Rolland, T., Tasan, M., Charlotiaux, B., Pevzner, S.J., Zhong, Q., Sahni, N., Yi, S., Lemmens, I., Fontanillo, C., Mosca, R., *et al.* (2014). A proteome-scale map of the human interactome network. *Cell* 159, 1212-1226.

Rossetto, D., Avvakumov, N., and Cote, J. (2012). Histone phosphorylation: a chromatin modification involved in diverse nuclear events. *Epigenetics* 7, 1098-1108.

Rossetto, D., Cramet, M., Wang, A.Y., Steunou, A.L., Lacoste, N., Schulze, J.M., Cote, V., Monnet-Saksouk, J., Piquet, S., Nourani, A., *et al.* (2014). Eaf5/7/3 form a functionally independent NuA4 submodule linked to RNA polymerase II-coupled nucleosome recycling. *EMBO J* 33, 1397-1415.

Rossetto, D., Truman, A.W., Kron, S.J., and Cote, J. (2010). Epigenetic modifications in double-strand break DNA damage signaling and repair. *Clin Cancer Res* 16, 4543-4552.

Rothbart, S.B., and Strahl, B.D. (2014). Interpreting the language of histone and DNA modifications. *Biochim Biophys Acta* 1839, 627-643.

Rountree, M.R., Bachman, K.E., and Baylin, S.B. (2000). DNMT1 binds HDAC2 and a new co-repressor, DMAP1, to form a complex at replication foci. *Nat Genet* 25, 269-277.

Ruhf, M.L., Braun, A., Papoulas, O., Tamkun, J.W., Randsholt, N., and Meister, M. (2001). The domino gene of *Drosophila* encodes novel members of the SWI2/SNF2 family of DNA-dependent ATPases, which contribute to the silencing of homeotic genes. *Development* 128, 1429-1441.

Ruhl, D.D., Jin, J., Cai, Y., Swanson, S., Florens, L., Washburn, M.P., Conaway, R.C., Conaway, J.W., and Chrivia, J.C. (2006). Purification of a human SRCAP complex that remodels chromatin by incorporating the histone variant H2A.Z into nucleosomes. *Biochemistry* 45, 5671-5677.

Sahtoe, D.D., van Dijk, W.J., Ekkebus, R., Ovaa, H., and Sixma, T.K. (2016). BAP1/ASXL1 recruitment and activation for H2A deubiquitination. *Nat Commun* 7, 10292.

Saksouk, N., Avvakumov, N., Champagne, K.S., Hung, T., Doyon, Y., Cayrou, C., Paquet, E., Ullah, M., Landry, A.J., Cote, V., *et al.* (2009). HBO1 HAT complexes target chromatin throughout gene coding regions via multiple PHD finger interactions with histone H3 tail. *Mol Cell* 33, 257-265.

Saleh, A., Schieltz, D., Ting, N., McMahon, S.B., Litchfield, D.W., Yates, J.R., 3rd, Lees-Miller, S.P., Cole, M.D., and Brandl, C.J. (1998). Tra1p is a component of the yeast Ada.Spt transcriptional regulatory complexes. *J Biol Chem* 273, 26559-26565.

Sapountzi, V., and Cote, J. (2011). MYST-family histone acetyltransferases: beyond chromatin. *Cell Mol Life Sci* 68, 1147-1156.

Sardiu, M.E., Cai, Y., Jin, J., Swanson, S.K., Conaway, R.C., Conaway, J.W., Florens, L., and Washburn, M.P. (2008). Probabilistic assembly of human protein interaction networks from label-free quantitative proteomics. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105, 1454-1459.

Sartori, A.A., Lukas, C., Coates, J., Mistrik, M., Fu, S., Bartek, J., Baer, R., Lukas, J., and Jackson, S.P. (2007). Human CtIP promotes DNA end resection. *Nature* 450, 509-514.

Schaft, D., Roguev, A., Kotovic, K.M., Shevchenko, A., Sarov, M., Neugebauer, K.M., and Stewart, A.F. (2003). The histone 3 lysine 36 methyltransferase, SET2, is involved in transcriptional elongation. *Nucleic Acids Res* 31, 2475-2482.

Scheuermann, J.C., de Ayala Alonso, A.G., Oktaba, K., Ly-Hartig, N., McGinty, R.K., Fraterman, S., Wilm, M., Muir, T.W., and Muller, J. (2010). Histone H2A deubiquitinase activity of the Polycomb repressive complex PR-DUB. *Nature* 465, 243-247.

Schmitt, J., Fischer, U., Heisel, S., Strickfaden, H., Backes, C., Ruggieri, A., Keller, A., Chang, P., and Meese, E. (2012). GAS41 amplification results in overexpression of a new spindle pole protein. *Genes Chromosomes Cancer* 51, 868-880.

Schotta, G., Lachner, M., Sarma, K., Ebert, A., Sengupta, R., Reuter, G., Reinberg, D., and Jenuwein, T. (2004). A silencing pathway to induce H3-K9 and H4-K20 trimethylation at constitutive heterochromatin. *Genes Dev* 18, 1251-1262.

Schulze, J.M., Wang, A.Y., and Kobor, M.S. (2009). YEATS domain proteins: a diverse family with many links to chromatin modification and transcription. *Biochem Cell Biol* 87, 65-75.

Schwartz, B.E., and Ahmad, K. (2005). Transcriptional activation triggers deposition and removal of the histone variant H3.3. *Genes Dev* 19, 804-814.

Schwartz, S., Meshorer, E., and Ast, G. (2009). Chromatin organization marks exon-intron structure. *Nat Struct Mol Biol* 16, 990-995.

Selleck, W., Fortin, I., Sermwittayawong, D., Cote, J., and Tan, S. (2005). The *Saccharomyces cerevisiae* Piccolo NuA4 histone acetyltransferase complex requires the Enhancer of Polycomb A domain and chromodomain to acetylate nucleosomes. *Mol Cell Biol* 25, 5535-5542.

Seo, J., Kim, K., Chang, D.Y., Kang, H.B., Shin, E.C., Kwon, J., and Choi, J.K. (2014). Genome-wide reorganization of histone H2AX toward particular fragile sites on cell activation. *Nucleic Acids Res* 42, 1016-1025.

Shalem, O., Sanjana, N.E., Hartenian, E., Shi, X., Scott, D.A., Mikkelsen, T.S., Heckl, D., Ebert, B.L., Root, D.E., Doench, J.G., *et al.* (2014). Genome-scale CRISPR-Cas9 knockout screening in human cells. *Science* 343, 84-87.

Shanbhag, N.M., Rafalska-Metcalf, I.U., Balane-Bolivar, C., Janicki, S.M., and Greenberg, R.A. (2010). ATM-dependent chromatin changes silence transcription in cis to DNA double-strand breaks. *Cell* 141, 970-981.

Shao, G., Lilli, D.R., Patterson-Fortin, J., Coleman, K.A., Morrissey, D.E., and Greenberg, R.A. (2009a). The Rap80-BRCC36 de-ubiquitinating enzyme complex antagonizes RNF8-Ubc13-dependent ubiquitination events at DNA double strand breaks. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 3166-3171.

Shao, G., Patterson-Fortin, J., Messick, T.E., Feng, D., Shanbhag, N., Wang, Y., and Greenberg, R.A. (2009b). MERIT40 controls BRCA1-Rap80 complex integrity and recruitment to DNA double-strand breaks. *Genes Dev* 23, 740-754.

Sharma, G.G., So, S., Gupta, A., Kumar, R., Cayrou, C., Avvakumov, N., Bhadra, U., Pandita, R.K., Porteus, M.H., Chen, D.J., *et al.* (2010). MOF and histone H4 acetylation at lysine 16 are critical for DNA damage response and double-strand break repair. *Mol Cell Biol* 30, 3582-3595.

Sharma, S., Hicks, J.K., Chute, C.L., Brennan, J.R., Ahn, J.Y., Glover, T.W., and Canman, C.E. (2012). REV1 and polymerase zeta facilitate homologous recombination repair. *Nucleic Acids Res* 40, 682-691.

Sharma, V., Khurana, S., Kubben, N., Abdelmohsen, K., Oberdoerffer, P., Gorospe, M., and Misteli, T. (2015). A BRCA1-interacting lncRNA regulates homologous recombination. *EMBO Rep* 16, 1520-1534.

Sharma, V., and Misteli, T. (2013). Noncoding RNAs in DNA damage and Repair. *FEBS letters* 587, 1832-1839.

Sheridan, A.M., Force, T., Yoon, H.J., O'Leary, E., Choukroun, G., Taheri, M.R., and Bonventre, J.V. (2001). PLIP, a novel splice variant of Tip60, interacts with group IV cytosolic phospholipase A(2), induces apoptosis, and potentiates prostaglandin production. *Mol Cell Biol* 21, 4470-4481.

Shi, J., Wang, Y., Zeng, L., Wu, Y., Deng, J., Zhang, Q., Lin, Y., Li, J., Kang, T., Tao, M., *et al.* (2014). Disrupting the interaction of BRD4 with diacetylated Twist suppresses tumorigenesis in basal-like breast cancer. *Cancer Cell* 25, 210-225.

Shi, X., Hong, T., Walter, K.L., Ewalt, M., Michishita, E., Hung, T., Carney, D., Pena, P., Lan, F., Kaadige, M.R., *et al.* (2006). ING2 PHD domain links histone H3 lysine 4 methylation to active gene repression. *Nature* 442, 96-99.

Shiio, Y., and Eisenman, R.N. (2003). Histone sumoylation is associated with transcriptional repression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 13225-13230.

Shiloh, Y., and Ziv, Y. (2013). The ATM protein kinase: regulating the cellular response to genotoxic stress, and more. *Nat Rev Mol Cell Biol* 14, 197-210.

Shimojo, H., Sano, N., Moriwaki, Y., Okuda, M., Horikoshi, M., and Nishimura, Y. (2008). Novel structural and functional mode of a knot essential for RNA binding activity of the Esa1 presumed chromodomain. *J Mol Biol* 378, 987-1001.

Shinohara, A., Ogawa, H., and Ogawa, T. (1992). Rad51 protein involved in repair and recombination in *S. cerevisiae* is a RecA-like protein. *Cell* 69, 457-470.

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.

Sinha, M., Watanabe, S., Johnson, A., Moazed, D., and Peterson, C.L. (2009). Recombinational repair within heterochromatin requires ATP-dependent chromatin remodeling. *Cell* 138, 1109-1121.

Sliva, D., Zhu, Y.X., Tsai, S., Kamine, J., and Yang, Y.C. (1999). Tip60 interacts with human interleukin-9 receptor alpha-chain. *Biochem Biophys Res Commun* 263, 149-155.

Smeenk, G., Wiegant, W.W., Vrolijk, H., Solari, A.P., Pastink, A., and van Attikum, H. (2010). The NuRD chromatin-remodeling complex regulates signaling and repair of DNA damage. *J Cell Biol* 190, 741-749.

Smerdon, M.J. (1991). DNA repair and the role of chromatin structure. *Curr Opin Cell Biol* 3, 422-428.

Smith, E.R., Cayrou, C., Huang, R., Lane, W.S., Cote, J., and Lucchesi, J.C. (2005). A human protein complex homologous to the *Drosophila* MSL complex is responsible for the majority of histone H4 acetylation at lysine 16. *Mol Cell Biol* 25, 9175-9188.

Smith, E.R., Eisen, A., Gu, W., Sattah, M., Pannuti, A., Zhou, J., Cook, R.G., Lucchesi, J.C., and Allis, C.D. (1998). ESA1 is a histone acetyltransferase that is essential for growth in yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 3561-3565.

Smith, K.T., and Workman, J.L. (2009). Introducing the acetylome. *Nat Biotechnol* 27, 917-919.

Smyth, G.K. (2004). Linear models and empirical bayes methods for assessing differential expression in microarray experiments. *Statistical applications in genetics and molecular biology* 3, Article3.

Soria, G., Polo, S.E., and Almouzni, G. (2012). Prime, repair, restore: the active role of chromatin in the DNA damage response. *Mol Cell* 46, 722-734.

Sowa, M.E., Bennett, E.J., Gygi, S.P., and Harper, J.W. (2009). Defining the human deubiquitinating enzyme interaction landscape. *Cell* 138, 389-403.

Spycher, C., Miller, E.S., Townsend, K., Pavic, L., Morrice, N.A., Janscak, P., Stewart, G.S., and Stucki, M. (2008). Constitutive phosphorylation of MDC1 physically links the MRE11-RAD50-NBS1 complex to damaged chromatin. *J Cell Biol* 181, 227-240.

Stender, J.D., Pascual, G., Liu, W., Kaikkonen, M.U., Do, K., Spann, N.J., Boutros, M., Perrimon, N., Rosenfeld, M.G., and Glass, C.K. (2012). Control of proinflammatory gene programs by regulated trimethylation and demethylation of histone H4K20. *Mol Cell* 48, 28-38.

Sternberg, S.H., and Doudna, J.A. (2015). Expanding the Biologist's Toolkit with CRISPR-Cas9. *Mol Cell* 58, 568-574.

Steunou, A.-L., Rossetto, D., and Cote, J. (2014). Regulating Chromatin by Histone Acetylation. In *Fundamentals of Chromatin*, J.L. Workman, and S.M. Abmayr, eds. (Springer New York), pp. 147-212.

Steunou, A.-L., Rossetto, D., and Côté, J. (2014). Regulating Chromatin by Histone Acetylation. In *Fundamentals of Chromatin* Workman, J.L., Abmayr, S.M., ed. (Springer-Verlag New York), 147-212.

Storici, F., Bebenek, K., Kunkel, T.A., Gordenin, D.A., and Resnick, M.A. (2007). RNA-templated DNA repair. *Nature* 447, 338-341.

Strahl, B.D., and Allis, C.D. (2000). The language of covalent histone modifications. *Nature* 403, 41-45.

Su, D., Hu, Q., Li, Q., Thompson, J.R., Cui, G., Fazly, A., Davies, B.A., Botuyan, M.V., Zhang, Z., and Mer, G. (2012). Structural basis for recognition of H3K56-acetylated histone H3-H4 by the chaperone Rtt106. *Nature* 483, 104-107.

Suganuma, T., Gutierrez, J.L., Li, B., Florens, L., Swanson, S.K., Washburn, M.P., Abmayr, S.M., and Workman, J.L. (2008). ATAC is a double histone acetyltransferase complex that stimulates nucleosome sliding. *Nat Struct Mol Biol* 15, 364-372.

Sun, Y., Jiang, X., Chen, S., Fernandes, N., and Price, B.D. (2005). A role for the Tip60 histone acetyltransferase in the acetylation and activation of ATM. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 13182-13187.

Sun, Y., Jiang, X., and Price, B.D. (2010). Tip60: connecting chromatin to DNA damage signaling. *Cell Cycle* 9, 930-936.

Sun, Y., Jiang, X., Xu, Y., Ayrappetov, M.K., Moreau, L.A., Whetstine, J.R., and Price, B.D. (2009). Histone H3 methylation links DNA damage detection to activation of the tumour suppressor Tip60. *Nat Cell Biol* 11, 1376-1382.

Sykes, S.M., Mellert, H.S., Holbert, M.A., Li, K., Marmorstein, R., Lane, W.S., and McMahon, S.B. (2006). Acetylation of the p53 DNA-binding domain regulates apoptosis induction. *Mol Cell* 24, 841-851.

Talbert, P.B., Ahmad, K., Almouzni, G., Ausio, J., Berger, F., Bhalla, P.L., Bonner, W.M., Cande, W.Z., Chadwick, B.P., Chan, S.W., *et al.* (2012). A unified phylogeny-based nomenclature for histone variants. *Epigenetics Chromatin* 5, 7.

Talbert, P.B., and Henikoff, S. (2010). Histone variants--ancient wrap artists of the epigenome. *Nat Rev Mol Cell Biol* 11, 264-275.

Tallen, G., and Riabowol, K. (2014). Keep-ING balance: tumor suppression by epigenetic regulation. *FEBS Lett* 588, 2728-2742.

Tanaka, A., Tanizawa, H., Sriswasdi, S., Iwasaki, O., Chatterjee, A.G., Speicher, D.W., Levin, H.L., Noguchi, E., and Noma, K. (2012). Epigenetic regulation of condensin-mediated genome organization during the cell cycle and upon DNA damage through histone H3 lysine 56 acetylation. *Mol Cell* 48, 532-546.

Tang, J., Cho, N.W., Cui, G., Manion, E.M., Shanbhag, N.M., Botuyan, M.V., Mer, G., and Greenberg, R.A. (2013). Acetylation limits 53BP1 association with damaged chromatin to promote homologous recombination. *Nat Struct Mol Biol* 20, 317-325.

Tang, Y., Luo, J., Zhang, W., and Gu, W. (2006). Tip60-dependent acetylation of p53 modulates the decision between cell-cycle arrest and apoptosis. *Mol Cell* 24, 827-839.

Taty-Taty, G.C., Courilleau, C., Quaranta, M., Carayon, A., Chailleux, C., Aymard, F., Trouche, D., and Canitrot, Y. (2014). H2A.Z depletion impairs proliferation and viability but not DNA double-strand breaks repair in human immortalized and tumoral cell lines. *Cell Cycle* 13, 399-407.

Taubert, S., Gorrini, C., Frank, S.R., Parisi, T., Fuchs, M., Chan, H.M., Livingston, D.M., and Amati, B. (2004). E2F-dependent histone acetylation and recruitment of the Tip60 acetyltransferase complex to chromatin in late G1. *Mol Cell Biol* 24, 4546-4556.

Thompson, P.R., Wang, D., Wang, L., Fulco, M., Pediconi, N., Zhang, D., An, W., Ge, Q., Roeder, R.G., Wong, J., *et al.* (2004). Regulation of the p300 HAT domain via a novel activation loop. *Nat Struct Mol Biol* 11, 308-315.

Thorslund, T., Ripplinger, A., Hoffmann, S., Wild, T., Uckelmann, M., Villumsen, B., Narita, T., Sixma, T.K., Choudhary, C., Bekker-Jensen, S., *et al.* (2015). Histone H1 couples initiation and amplification of ubiquitin signalling after DNA damage. *Nature* 527, 389-393.

Thorvaldsdottir, H., Robinson, J.T., and Mesirov, J.P. (2013). Integrative Genomics Viewer (IGV): high-performance genomics data visualization and exploration. *Brief Bioinform* 14, 178-192.

Tkac, J., Xu, G., Adhikary, H., Young, J.T., Gallo, D., Escibano-Diaz, C., Krietsch, J., Orthwein, A., Munro, M., Sol, W., *et al.* (2016). HELB Is a Feedback Inhibitor of DNA End Resection. *Mol Cell* 61, 405-418.

Toiber, D., Erdel, F., Bouazoune, K., Silberman, D.M., Zhong, L., Mulligan, P., Sebastian, C., Cosentino, C., Martinez-Pastor, B., Giacosa, S., *et al.* (2013). SIRT6 Recruits SNF2H to DNA Break Sites, Preventing Genomic Instability through Chromatin Remodeling. *Molecular Cell* 51, 454-468.

Trojer, P., Cao, A.R., Gao, Z., Li, Y., Zhang, J., Xu, X., Li, G., Losson, R., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., *et al.* (2011). L3MBTL2 protein acts in concert with PcG protein-mediated monoubiquitination of H2A to establish a repressive chromatin structure. *Mol Cell* 42, 438-450.

Trojer, P., Li, G., Sims, R.J., 3rd, Vaquero, A., Kalakonda, N., Bocconi, P., Lee, D., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Nimer, S.D., *et al.* (2007). L3MBTL1, a histone-methylation-dependent chromatin lock. *Cell* 129, 915-928.

Tsai, S.Q., Wyvekens, N., Khayter, C., Foden, J.A., Thapar, V., Reyon, D., Goodwin, M.J., Aryee, M.J., and Joung, J.K. (2014). Dimeric CRISPR RNA-guided FokI nucleases for highly specific genome editing. *Nature biotechnology* 32, 569-576.

Tuzon, C.T., Spektor, T., Kong, X., Congdon, L.M., Wu, S., Schotta, G., Yokomori, K., and Rice, J.C. (2014). Concerted activities of distinct H4K20 methyltransferases at DNA double-strand breaks regulate 53BP1 nucleation and NHEJ-directed repair. *Cell Rep* 8, 430-438.

Tyteca, S., Vandromme, M., Legube, G., Chevillard-Briet, M., and Trouche, D. (2006). Tip60 and p400 are both required for UV-induced apoptosis but play antagonistic roles in cell cycle progression. *EMBO J* 25, 1680-1689.

Ui, A., Nagaura, Y., and Yasui, A. (2015). Transcriptional elongation factor ENL phosphorylated by ATM recruits polycomb and switches off transcription for DSB repair. *Mol Cell* 58, 468-482.

Unal, E., Arbel-Eden, A., Sattler, U., Shroff, R., Lichten, M., Haber, J.E., and Koshland, D. (2004). DNA damage response pathway uses histone modification to assemble a double-strand break-specific cohesin domain. *Mol Cell* 16, 991-1002.

Urnov, F.D., Rebar, E.J., Holmes, M.C., Zhang, H.S., and Gregory, P.D. (2010). Genome editing with engineered zinc finger nucleases. *Nat Rev Genet* 11, 636-646.

Utle, R.T., Lacoste, N., Jobin-Robitaille, O., Allard, S., and Cote, J. (2005). Regulation of NuA4 histone acetyltransferase activity in transcription and DNA repair by phosphorylation of histone H4. *Mol Cell Biol* 25, 8179-8190.

Utle, R.T., Owen-Hughes, T.A., Juan, L.J., Cote, J., Adams, C.C., and Workman, J.L. (1996). In vitro analysis of transcription factor binding to nucleosomes and nucleosome disruption/displacement. *Methods Enzymol* 274, 276-291.

Vakoc, C.R., Sachdeva, M.M., Wang, H., and Blobel, G.A. (2006). Profile of histone lysine methylation across transcribed mammalian chromatin. *Mol Cell Biol* 26, 9185-9195.

van Attikum, H., Fritsch, O., Hohn, B., and Gasser, S.M. (2004). Recruitment of the INO80 Complex by H2A Phosphorylation Links ATP-Dependent Chromatin Remodeling with DNA Double-Strand Break Repair. *Cell* 119, 777-788.

van der Heijden, G.W., Derijck, A.A., Posfai, E., Giele, M., Pelczar, P., Ramos, L., Wansink, D.G., van der Vlag, J., Peters, A.H., and de Boer, P. (2007). Chromosome-wide nucleosome replacement and H3.3 incorporation during mammalian meiotic sex chromosome inactivation. *Nat Genet* 39, 251-258.

Van Leene, J., Hollunder, J., Eeckhout, D., Persiau, G., Van De Slijke, E., Stals, H., Van Isterdael, G., Verkest, A., Neiryck, S., Buffel, Y., *et al.* (2010). Targeted interactomics reveals a complex core cell cycle machinery in *Arabidopsis thaliana*. *Molecular systems biology* 6, 397.

van Leeuwen, F., Gafken, P.R., and Gottschling, D.E. (2002). Dot1p modulates silencing in yeast by methylation of the nucleosome core. *Cell* 109, 745-756.

van Nuland, R., and Gozani, O. (2015). H4K20 methylation: expanding the signaling potential of the proteome one methyl moiety at a time. *Mol Cell Proteomics*.

van Nuland, R., and Gozani, O. (2016). Histone H4 Lysine 20 (H4K20) Methylation, Expanding the Signaling Potential of the Proteome One Methyl Moiety at a Time. *Mol Cell Proteomics* 15, 755-764.

Venkatesh, S., and Workman, J.L. (2014). Recognizing methylated histone variant H3.3 to prevent tumors. *Cell Res* 24, 649-650.

Venters, B.J., Wachi, S., Mavrich, T.N., Andersen, B.E., Jena, P., Sinnamon, A.J., Jain, P., Rolleri, N.S., Jiang, C., Hemeryck-Walsh, C., *et al.* (2011). A comprehensive genomic binding map of gene and chromatin regulatory proteins in *Saccharomyces*. *Mol Cell* 41, 480-492.

Vogelstein, B., Papadopoulos, N., Velculescu, V.E., Zhou, S., Diaz, L.A., Jr., and Kinzler, K.W. (2013). Cancer genome landscapes. *Science* 339, 1546-1558.

Voss, A.K., and Thomas, T. (2009). MYST family histone acetyltransferases take center stage in stem cells and development. *Bioessays* 31, 1050-1061.

Walden, H., and Deans, A.J. (2014). The Fanconi anemia DNA repair pathway: structural and functional insights into a complex disorder. *Annu Rev Biophys* 43, 257-278.

Wang, L., Xie, L., Ramachandran, S., Lee, Y., Yan, Z., Zhou, L., Krajewski, K., Liu, F., Zhu, C., Chen, D.J., *et al.* (2015). Non-canonical Bromodomain within DNA-PKcs Promotes DNA Damage Response and Radioresistance through Recognizing an IR-Induced Acetyl-Lysine on H2AX. *Chem Biol* 22, 849-861.

Wang, T., Wei, J.J., Sabatini, D.M., and Lander, E.S. (2014). Genetic screens in human cells using the CRISPR-Cas9 system. *Science* 343, 80-84.

Wang, Y., and Li, G. (2006). ING3 promotes UV-induced apoptosis via Fas/caspase-8 pathway in melanoma cells. *J Biol Chem* 281, 11887-11893.

Wang, Z., Zang, C., Cui, K., Schones, D.E., Barski, A., Peng, W., and Zhao, K. (2009). Genome-wide mapping of HATs and HDACs reveals distinct functions in active and inactive genes. *Cell* 138, 1019-1031.

Washburn, M.P. (2016). There is no human interactome. *Genome Biol* 17, 48.

Weber, C.M., and Henikoff, S. (2014). Histone variants: dynamic punctuation in transcription. *Genes Dev* 28, 672-682.

Wei, W., Ba, Z., Gao, M., Wu, Y., Ma, Y., Amiard, S., White, C.I., Rendtlew Danielsen, J.M., Yang, Y.G., and Qi, Y. (2012). A role for small RNAs in DNA double-strand break repair. *Cell* 149, 101-112.

Wen, H., Li, Y., Xi, Y., Jiang, S., Stratton, S., Peng, D., Tanaka, K., Ren, Y., Xia, Z., Wu, J., *et al.* (2014). ZMYND11 links histone H3.3K36me3 to transcription elongation and tumour suppression. *Nature* 508, 263-268.

West, L.E., Roy, S., Lachmi-Weiner, K., Hayashi, R., Shi, X., Appella, E., Kutateladze, T.G., and Gozani, O. (2010). The MBT repeats of L3MBTL1 link SET8-mediated p53 methylation at lysine 382 to target gene repression. *J Biol Chem* 285, 37725-37732.

Wright, W.D., and Heyer, W.D. (2014). Rad54 functions as a heteroduplex DNA pump modulated by its DNA substrates and Rad51 during D loop formation. *Mol Cell* 53, 420-432.

Wu, J., Chen, Y., Lu, L.Y., Wu, Y., Paulsen, M.T., Ljungman, M., Ferguson, D.O., and Yu, X. (2011). Chfr and RNF8 synergistically regulate ATM activation. *Nat Struct Mol Biol* 18, 761-768.

Wu, W.H., Alami, S., Luk, E., Wu, C.H., Sen, S., Mizuguchi, G., Wei, D., and Wu, C. (2005). Swc2 is a widely conserved H2AZ-binding module essential for ATP-dependent histone exchange. *Nat Struct Mol Biol* 12, 1064-1071.

Wyatt, H.D., and West, S.C. (2014). Holliday junction resolvases. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 6, a023192.

Xiao, A., Li, H., Shechter, D., Ahn, S.H., Fabrizio, L.A., Erdjument-Bromage, H., Ishibe-Murakami, S., Wang, B., Tempst, P., Hofmann, K., *et al.* (2009). WSTF regulates the H2A.X DNA damage response via a novel tyrosine kinase activity. *Nature* 457, 57-62.

Xiong, X., Du, Z., Wang, Y., Feng, Z., Fan, P., Yan, C., Willers, H., and Zhang, J. (2015). 53BP1 promotes microhomology-mediated end-joining in G1-phase cells. *Nucleic Acids Res* 43, 1659-1670.

Xu, C., Xu, Y., Gursoy-Yuzugullu, O., and Price, B.D. (2012a). The histone variant macroH2A1.1 is recruited to DSBs through a mechanism involving PARP1. *FEBS Lett* 586, 3920-3925.

Xu, Y., Ayrappetov, M.K., Xu, C., Gursoy-Yuzugullu, O., Hu, Y., and Price, B.D. (2012b). Histone H2A.Z controls a critical chromatin remodeling step required for DNA double-strand break repair. *Mol Cell* 48, 723-733.

Xu, Y., Sun, Y., Jiang, X., Ayrapetov, M.K., Moskwa, P., Yang, S., Weinstock, D.M., and Price, B.D. (2010). The p400 ATPase regulates nucleosome stability and chromatin ubiquitination during DNA repair. *J Cell Biol* 191, 31-43.

Yamada, K., Kunishima, N., Mayanagi, K., Ohnishi, T., Nishino, T., Iwasaki, H., Shinagawa, H., and Morikawa, K. (2001). Crystal structure of the Holliday junction migration motor protein RuvB from *Thermus thermophilus* HB8. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 1442-1447.

Yamagata, K., and Kitabayashi, I. (2009). Sirt1 physically interacts with Tip60 and negatively regulates Tip60-mediated acetylation of H2AX. *Biochem Biophys Res Commun* 390, 1355-1360.

Yan, Y., Harper, S., Speicher, D.W., and Marmorstein, R. (2002). The catalytic mechanism of the ESA1 histone acetyltransferase involves a self-acetylated intermediate. *Nat Struct Biol* 9, 862-869.

Yang, C., Wu, J., and Zheng, Y.G. (2012). Function of the active site lysine autoacetylation in Tip60 catalysis. *PLoS One* 7, e32886.

Yang, X.J., and Seto, E. (2008). The Rpd3/Hda1 family of lysine deacetylases: from bacteria and yeast to mice and men. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9, 206-218.

Yang, X.J., and Ullah, M. (2007). MOZ and MORF, two large MYSTic HATs in normal and cancer stem cells. *Oncogene* 26, 5408-5419.

Yi, J., Huang, X., Yang, Y., Zhu, W.G., Gu, W., and Luo, J. (2014). Regulation of histone acetyltransferase TIP60 function by histone deacetylase 3. *J Biol Chem* 289, 33878-33886.

Yu, H., Pak, H., Hammond-Martel, I., Ghram, M., Rodrigue, A., Daou, S., Barbour, H., Corbeil, L., Hebert, J., Drobetsky, E., *et al.* (2014). Tumor suppressor and deubiquitinase BAP1 promotes DNA double-strand break repair. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111, 285-290.

Yu, X., and Baer, R. (2000). Nuclear localization and cell cycle-specific expression of CtIP, a protein that associates with the BRCA1 tumor suppressor. *J Biol Chem* 275, 18541-18549.

Yu, X., and Chen, J. (2004). DNA damage-induced cell cycle checkpoint control requires CtIP, a phosphorylation-dependent binding partner of BRCA1 C-terminal domains. *Mol Cell Biol* 24, 9478-9486.

Yu, X., Fu, S., Lai, M., Baer, R., and Chen, J. (2006). BRCA1 ubiquitinates its phosphorylation-dependent binding partner CtIP. *Genes Dev* 20, 1721-1726.

Yuan, H., Rossetto, D., Mellert, H., Dang, W., Srinivasan, M., Johnson, J., Hodawadekar, S., Ding, E.C., Speicher, K., Abshiru, N., *et al.* (2012). MYST protein acetyltransferase activity requires active site lysine autoacetylation. *EMBO J* 31, 58-70.

Yuen, B.T., and Knoepfler, P.S. (2013). Histone H3.3 mutations: a variant path to cancer. *Cancer Cell* 24, 567-574.

Zeng, L., Zhang, Q., Li, S., Plotnikov, A.N., Walsh, M.J., and Zhou, M.M. (2010). Mechanism and regulation of acetylated histone binding by the tandem PHD finger of DPF3b. *Nature* 466, 258-262.

Zentner, G.E., and Henikoff, S. (2013). Regulation of nucleosome dynamics by histone modifications. *Nat Struct Mol Biol* 20, 259-266.

Zhang, H., Richardson, D.O., Roberts, D.N., Utley, R., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Cote, J., and Cairns, B.R. (2004). The Yaf9 component of the SWR1 and NuA4 complexes is required for proper gene expression, histone H4 acetylation, and Htz1 replacement near telomeres. *Mol Cell Biol* 24, 9424-9436.

Zhang, H., Roberts, D.N., and Cairns, B.R. (2005). Genome-wide dynamics of Htz1, a histone H2A variant that poises repressed/basal promoters for activation through histone loss. *Cell* 123, 219-231.

Zhang, P., Du, J., Sun, B., Dong, X., Xu, G., Zhou, J., Huang, Q., Liu, Q., Hao, Q., and Ding, J. (2006). Structure of human MRG15 chromo domain and its binding to Lys36-methylated histone H3. *Nucleic Acids Res* 34, 6621-6628.

Zhang, Y., Liu, T., Meyer, C.A., Eeckhoute, J., Johnson, D.S., Bernstein, B.E., Nusbaum, C., Myers, R.M., Brown, M., Li, W., *et al.* (2008). Model-based analysis of ChIP-Seq (MACS). *Genome Biol* 9, R137.

Zhao, G.Y., Sonoda, E., Barber, L.J., Oka, H., Murakawa, Y., Yamada, K., Ikura, T., Wang, X., Kobayashi, M., Yamamoto, K., *et al.* (2007). A critical role for the ubiquitin-conjugating enzyme Ubc13 in initiating homologous recombination. *Mol Cell* 25, 663-675.

Zheng, H., Seit-Nebi, A., Han, X., Aslanian, A., Tat, J., Liao, R., Yates, J.R., 3rd, and Sun, P. (2013a). A posttranslational modification cascade involving p38, Tip60, and PRAK mediates oncogene-induced senescence. *Mol Cell* 50, 699-710.

Zheng, Y., Thomas, P.M., and Kelleher, N.L. (2013b). Measurement of acetylation turnover at distinct lysines in human histones identifies long-lived acetylation sites. *Nat Commun* 4, 2203.

Zhou, W., Zhu, P., Wang, J., Pascual, G., Ohgi, K.A., Lozach, J., Glass, C.K., and Rosenfeld, M.G. (2008). Histone H2A monoubiquitination represses transcription by inhibiting RNA polymerase II transcriptional elongation. *Mol Cell* 29, 69-80.

Zhu, P., Zhou, W., Wang, J., Puc, J., Ohgi, K.A., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Glass, C.K., and Rosenfeld, M.G. (2007). A histone H2A deubiquitinase complex coordinating histone acetylation and H1 dissociation in transcriptional regulation. *Mol Cell* 27, 609-621.

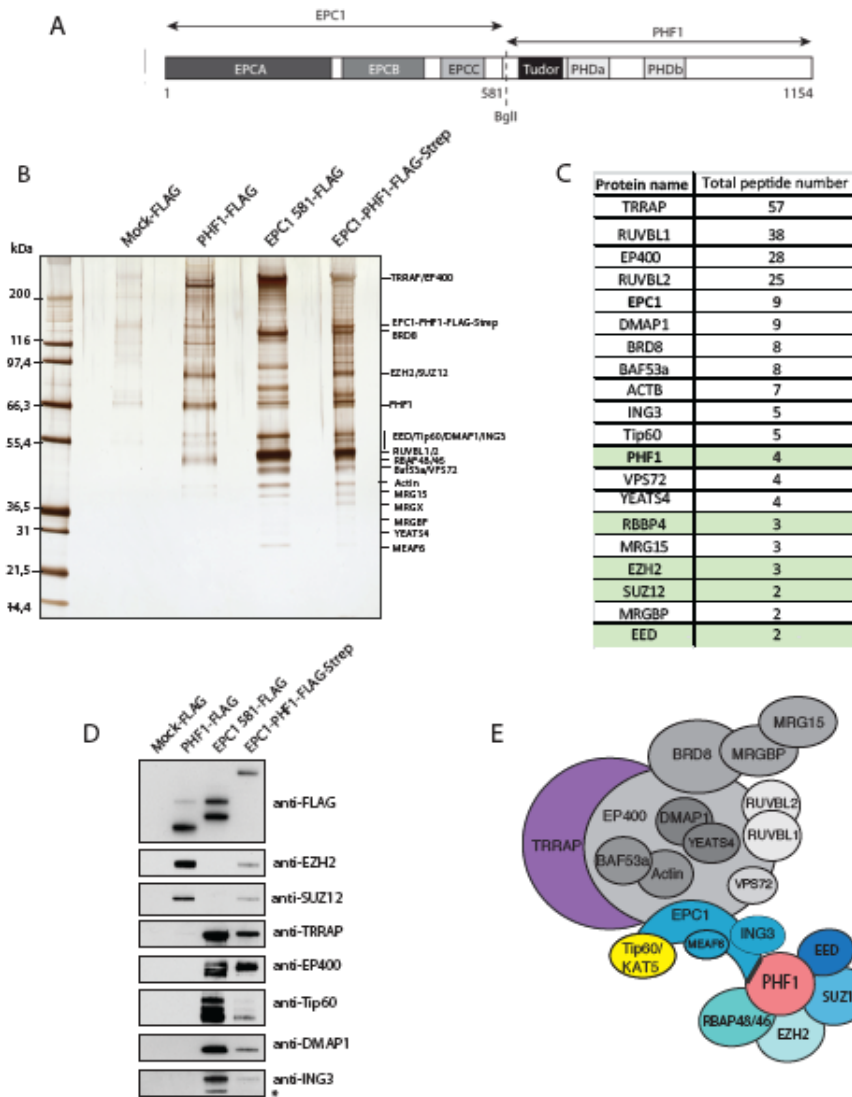
Zhu, Z., Chung, W.H., Shim, E.Y., Lee, S.E., and Ira, G. (2008). Sgs1 helicase and two nucleases Dna2 and Exo1 resect DNA double-strand break ends. *Cell* 134, 981-994.

Zimmermann, M., and de Lange, T. (2014). 53BP1: pro choice in DNA repair. *Trends Cell Biol* 24, 108-117.

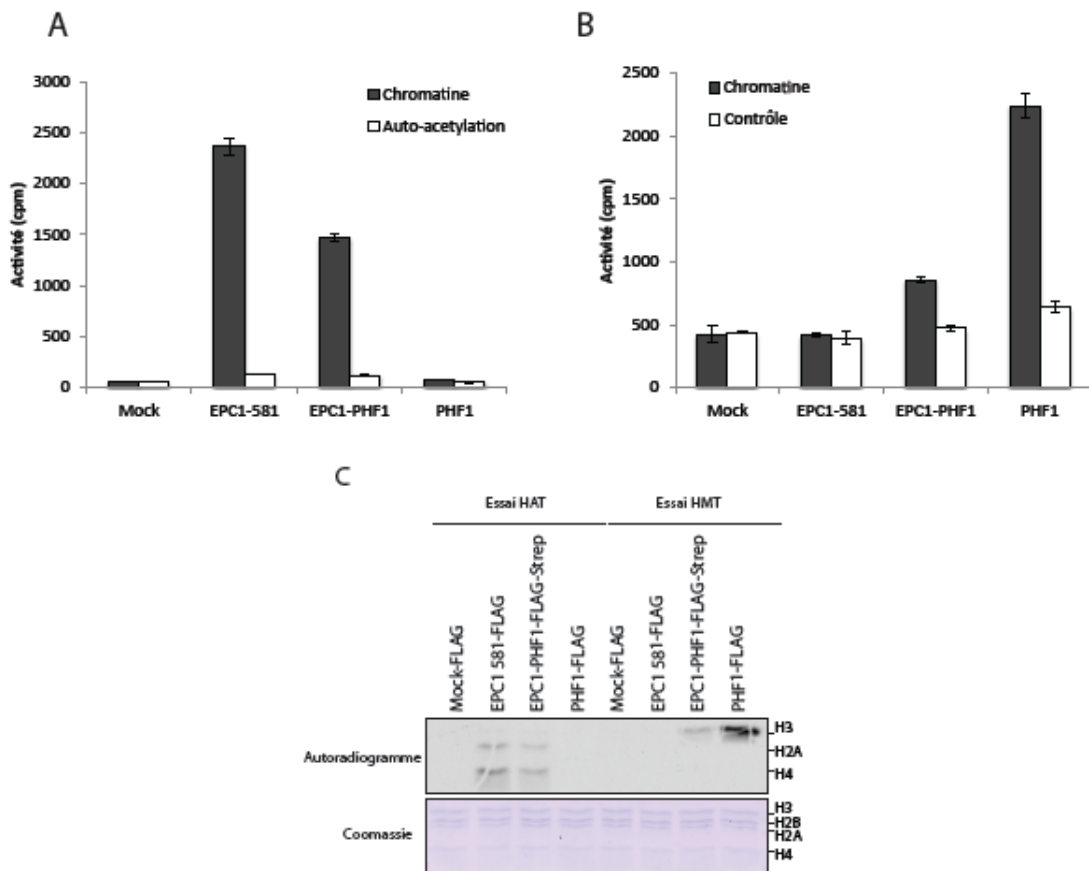
Appendices

Avant-propos

Les résultats non publiés présentés dans cette section dépassent le cadre des chapitres 2, 3 et 4 mais apportent des éléments de discussion importants dans le cadre de cette thèse. Les appendices 1 et 2 se rapportent à un projet mené par Nikita Avvakumov qui traite de l'étude d'une fusion oncogénique impliquant la sous-unité EPC1 et retrouvée dans certains cancers. Les analyses effectuées ont permis de confirmer la présence de MBTD1 dans le complexe TIP60 et suggèrent que la perte de MBTD1 dans la fusion est partiellement responsable du phénotype oncogénique. L'appendice 3 porte sur l'étude des isoformes d'une sous-unité du complexe TIP60. L'appendice 4 contient des données supplémentaires non incluses dans le manuscrit présenté au chapitre 3 sur la caractérisation des domaines de MBTD1 responsables de sa liaison à la chromatine. L'appendice 5 présente des données préliminaires suggérant que PALB2 et BRCA2 sont des substrats d'acétylation de TIP60 *in vitro*. Ces résultats nous permettent de poser des hypothèses intéressantes sur les fonctions plus tardives de TIP60 au cours de la réparation par recombinaison homologue. L'appendice 6 présente des données d'analyses par spectrométrie de masse de complexe TIP60 purifié. Ces analyses montrent que TIP60 co-purifie avec H2AZ acétylée et remettent en question le modèle proposé dans la littérature. L'appendice 7 contient des données de CHIP-seq en condition de dommages de l'ADN qui n'ont pas été intégrées au chapitre 3. L'appendice 8 est un manuscrit soumis à la revue scientifique *Journal of biological chemistry*, qui doit être mis en parallèle des travaux présentés en chapitre 4. Enfin, l'appendice 9 est un commentaire publié dans la revue scientifique *Cell Cycle*, relatif à une publication liée à nos travaux.

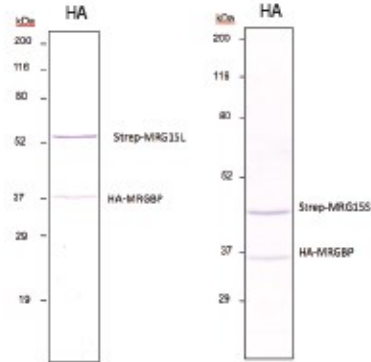


Appendice 1: La fusion oncogénique EPC1-PHF1 associe les complexes PRC2 et TIP60 dépourvu de la sous-unité MBTD1. (A) Schéma représentatif de la translocation chromosomique trouvée dans des sarcomes utérins et conduisant à une fusion des protéines EPC1 et PHF1, sous-unités des complexes TIP60 et PRC2 respectivement (Micci et al. Cancer Res. 2006). La chimère résultant du réarrangement produit une protéine contenant les 581 premiers acides aminés d'EPC1 fusionnés à PHF1 pleine longueur, dans le même cadre de lecture. (B) Purification de la fusion EPC1-PHF1 en cellules K562. La fusion EPC1-PHF1 a été purifiée par immunoprécipitation anti-FLAG à partir d'une lignée stable en K562 établie grâce à l'insertion d'une cassette au locus AAVS1 (voir chapitres 2 et 3). Les purifications contrôles: mock, PHF1 et EPC1(1-581) ont été effectuées selon le même protocole. Les sous-unités ont été identifiées par spectrométrie de masse et par western blot. (C) Analyse de la fusion EPC1-PHF1 par spectrométrie de masse. Le complexe purifié en (B) comprend les 2 complexes TIP60 et PRC2. Les sous-unités du complexe PRC2 sont identifiées en vert. (D) Analyse de la fusion EPC1-PHF1 et des complexes annexes par western blot. Les complexes purifiés en (B) ont été analysés par western blot avec les différents anticorps spécifiques pour certaines sous-unités de PRC2 ou TIP60. (E) Représentation schématique de la fusion EPC1-PHF1 conduisant à la formation d'un méga-complexe contenant les 5 sous-unités de PRC2 et l'ensemble du complexe TIP60 excepté MBTD1 qui lie le domaine C-terminal d'EPC1 (résidus 582 à 836) perdu lors de la fusion (la présence de MRGX et MEAF6 a été confirmée; données non-montrées).

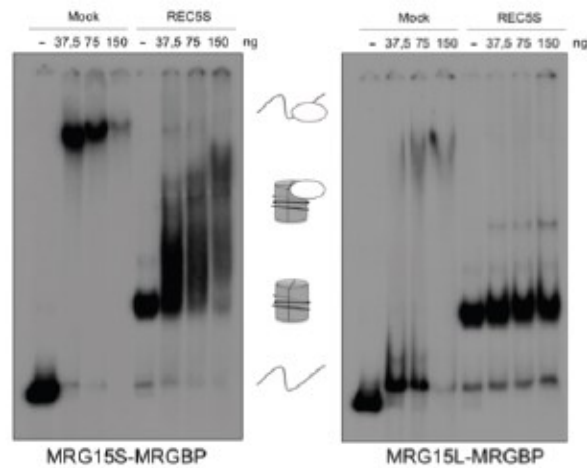


Appendice 2: La fusion EPC1-PHF1 possède des activités acétyltransférase et méthyltransférase in vitro (A) La fusion EPC1-PHF1 présente une activité acétyltransférase. Essai d'acétylation in vitro avec les différentes purifications EPC1-PHF1-FLAG-Strep, EPC1(1-581), PHF1-FLAG et mock (appendice 4). De courts oligonucléosomes (chromatine) purifiés à partir de cellules humaines sont utilisés comme substrat de la réaction enzymatique. En l'absence de substrat, les complexes s'auto-acétylent. (B) La fusion EPC1-PHF1 présente une activité méthyltransférase. Essai de méthylation in vitro avec les différentes purifications EPC1-PHF1-FLAG-Strep, EPC1(1-581), PHF1-FLAG et mock (appendice 4). De courts oligonucléosomes (chromatine) purifiés à partir de cellules humaines sont utilisés comme substrat de la réaction enzymatique. Le contrôle a été effectué sans substrat. (C) La fusion EPC1-PHF1 présente la même spécificité que TIP60 et PRC2. Les essais effectués en A et B ont été analysés sur gel afin de mettre en évidence l'acétylation de H2A / H4 et la méthylation de H3 par la fusion comme EPC1(1-581) et PHF1 respectivement.

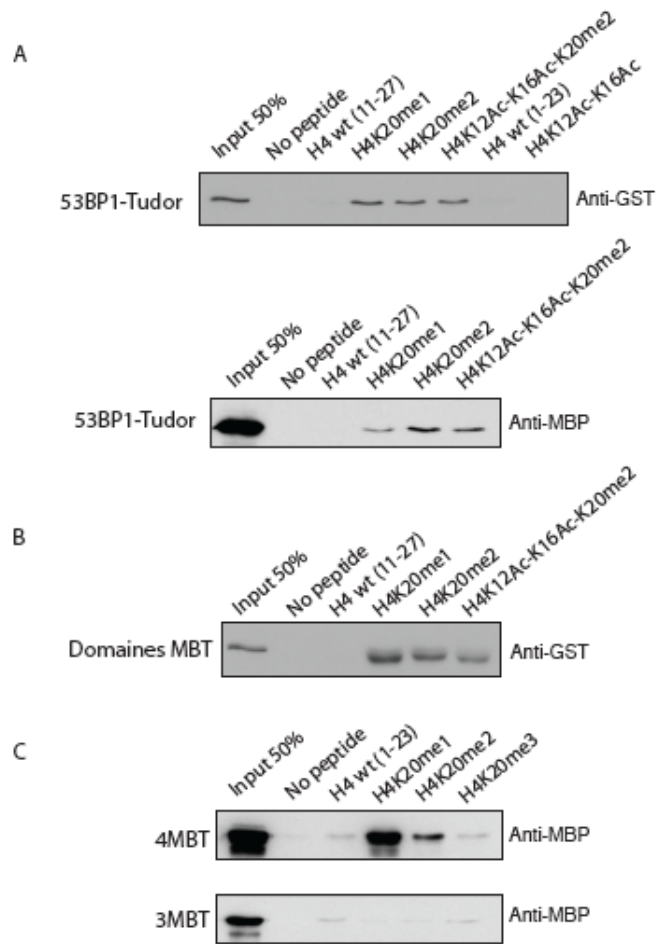
A



B

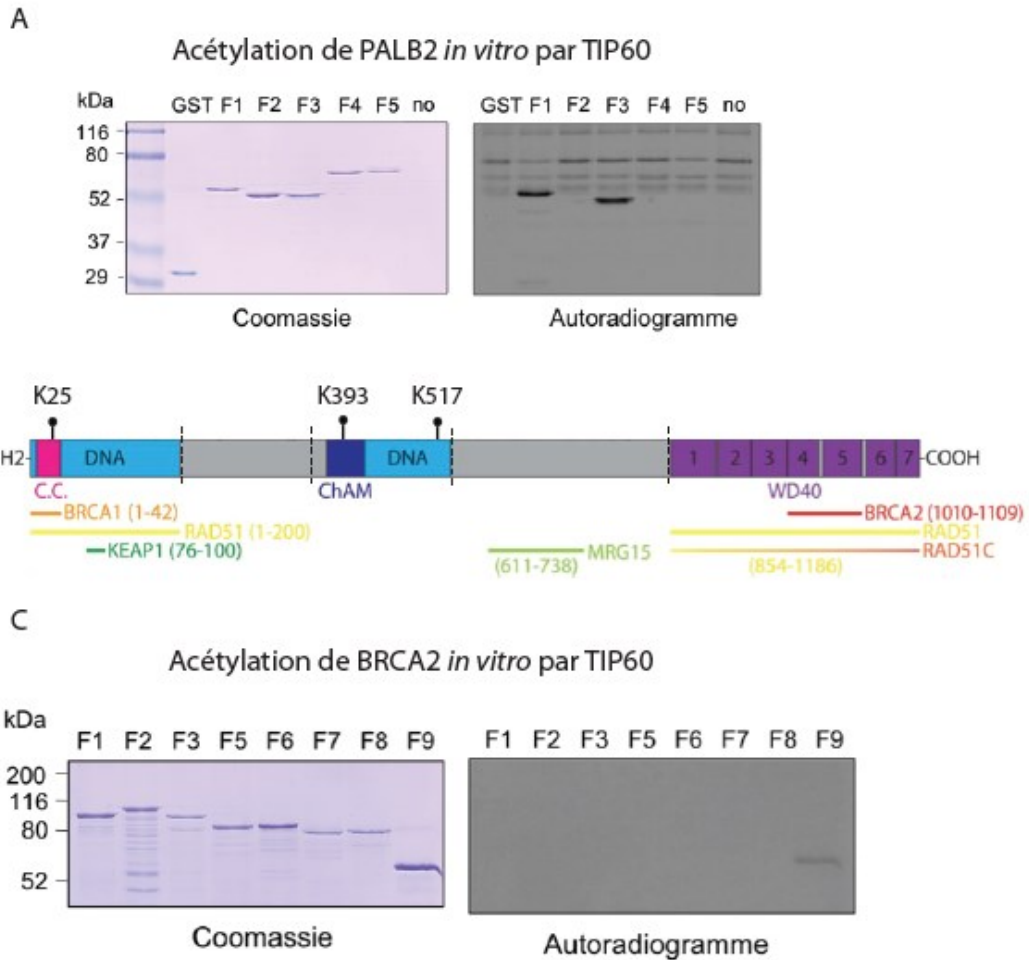


Appendice 3 : Les isoformes long et court de MRG15 lient la chromatine de manière différentielle. (A) Purification du sous-module MRGP-MRG15 contenant l'isoforme long (L) ou court (S ou isoforme canonique) en baculovirus. Les cellules SF9 ont été co-infectées avec les virus individuels et récoltées 48h après infection. Les différents complexes ont été purifiés par immunoprécipitation anti-HA et analysés sur gel coloré au Coomassie. L'isoforme L présente une insertion de 39 acides aminés au sein du chromodomaine, homologue à EAF3, et qui impacte potentiellement sa liaison à la chromatine. (B) MRG15L lie moins efficacement la chromatine in vitro. Expérience de liaison à la chromatine par méthode EMSA avec des mono-nucléosomes reconstitués in vitro à partir de chromatine native issue de cellules HeLa donc contenant des histones porteurs de marques épigénétiques diverses.



Appendice 4: Caractérisation des domaines MBT de MBTD1 et impacte de l'acétylation de H4K16

(A) Effet de H4K16ac sur la liaison du TTD de 53BP1 (ou 53BP1-Tudor) à H4K20me2. Les domaines tandem-Tudor de 53BP1 fusionnés à la GST ou MBP ont été purifiés en bactérie et utilisés dans des expériences d'interaction avec des peptides d'histone biotinylés modifiés (méthylés et/ou acétylés; résidus 11 à 27). Comme décrit précédemment (Tang et al 2013), l'acétylation de H4K16 semble affecter l'interaction de 53BP1 avec H4K20me2 in vitro. (B) Effet de H4K16ac sur la liaison des domaines MBT de MBTD1 à H4K20me2. Comme pour 53BP1, les domaines MBT de MBTD1 semblent être affectés par l'acétylation de H4K16 in vitro. (C) MBTD1 reconnaît H4K20me à travers son domaine MBT4. Expérience d'interaction in vitro des domaines MBT (4MBT: domaines 1 à 4; 3MBT: domaines 1 à 3) avec des peptides d'histone (résidus 1 à 23) modifiés. Comme suggéré par l'étude structurale (Eryilmaz et al. 2009), la délétion du quatrième domaine MBT bloque l'interaction avec la H4 méthylé. Le domaine MBT4 seul n'est pas soluble.



Appendice 5: PALB2 et BRCA2 sont des nouveaux substrats potentiels de TIP60.

(A) PALB2 est acétylée *in vitro* par TIP60 au niveau de certains domaines fonctionnels notamment ses domaines de liaison à l'ADN. Essai d'acétylation *in vitro* des troncations de PALB2 (à gauche : gel coloré au Coomassie) par le complexe TIP60 natif avec de l'acétyl-CoA marqué radioactivement et révélé par autoradiographie (à droite). L'acétylation cible les fragments 1 et 3 (Buisson et al. 2010). La GST seule est utilisée comme contrôle négatif; no: pas de substrat; les bandes résiduelles correspondent à l'autoacétylation du complexe TIP60 (voir chapitre 4). (B) Sites d'acétylation de PALB2 par TIP60 *in vitro*. Représentation schématique de PALB2 et de ses sites d'acétylation par TIP60 *in vitro* identifiés par spectrométrie de masse: résidus K25, K393 et K517. L'essai effectué en (A) a été répété avec de l'acétyl-CoA froid suivi par l'analyse par spectrométrie de masse des fragments 1 et 3. Les fragments sont indiqués par des pointillés ainsi que les domaines d'interaction fonctionnels (adapté de Pauty et al 2014). ChAM: chromatin association motif ; domaine d'oligomérisation: résidus 372 à 445. (C) BRCA2 est acétylée *in vitro* par TIP60 au niveau de son extrémité C-terminale. Essai d'acétylation *in vitro* de troncations de BRCA2 (à gauche : gel coloré au Coomassie) par le complexe TIP60 natif avec de l'acétyl-CoA marqué radioactivement et révélé par autoradiographie (à droite). L'acétylation cible le fragment 9 qui contient le NLS et la sérine 3291 phosphorylée par CDK (Esashi et al.,2005). L'analyse par spectrométrie de masse de cet essai n'a malheureusement pas permis d'identifier de résidus.

A

Hit Gene Name	Hit Mascot Score	Unique Peptide Number	Peptide Modifications	Peptide Mascot Score	Peptide Sequence	Peptide Location
H2AFV	298	6	3 Acetyl (K);K4;K7;K11	54	AGGKAGKDSGKAK	2-14

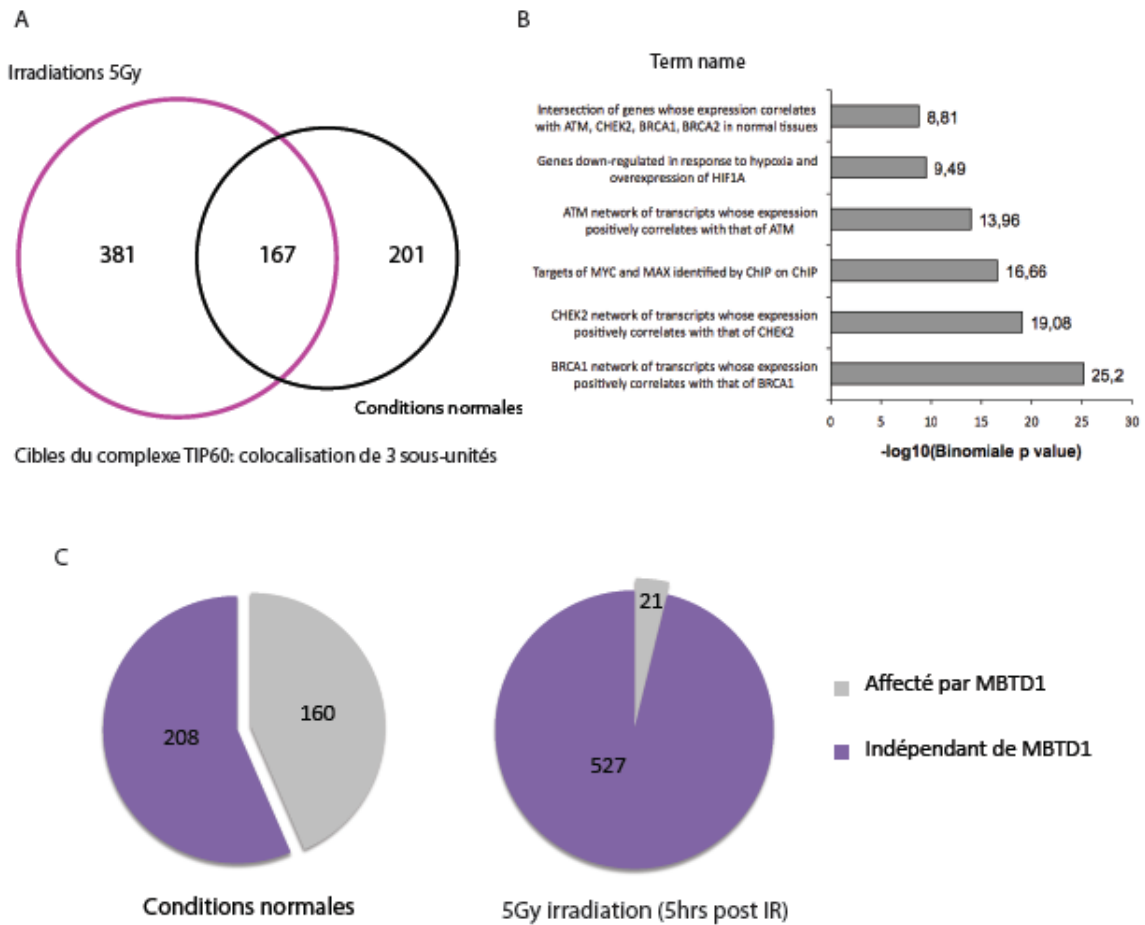
B

H2AZ
MAGGKAGKDSGKAKAKAVSRQRAGLQFPVGRHRHLKTRTTSHGRVGGATAAVYSAILE
YLTAEVLELAGNASKDLKVKRITPRHLQLAIRGDEELDSLKATIAGGGVIPHIIKSLIGKKGQQ
KTA

Appendice 6: H2AZ acétylé co-purifie avec le complexe TIP60 natif.

(A) Identification d'un peptide unique à H2AZ acétylé par spectrométrie de masse à partir d'une purification du complexe TIP60 natif. L'analyse du complexe EPC1-3xFLAG purifié à partir de cellules K562 (voir chapitre 4; figure 4.1; en absence de dommage) a permis d'identifier un peptide de H2AZ porteur de 3 acétylations.

(B) Séquence de H2AZ. Ses résidus K5, K8 et K12 acétylés sont identifiés en vert.



Appendice 7: Ciblage de TIP60 au sein du génome en condition de dommages de l'ADN

(A) Analyse par ChIP-seq de la localisation du complexe TIP60 à l'échelle du génome entier en conditions normales ou après irradiations (5Gy). La localisation du complexe est définie par la colocalisation de 3 sous-unités uniques au complexe soit EPC1, Tip60/KAT5 et MBTD1. En conditions normales, TIP60 se situe aux promoteurs de gènes activement transcrits (368 régions; voir chapitre 3). Des expériences similaires de ChIP-seq anti-FLAG ont été effectuées sur les mêmes lignées après irradiation des cellules (5h après 5Gy d'irradiation). Dans ces conditions, 558 régions ont pu être identifiées. (B) Analyse des régions du génome liées par le complexe TIP60 en conditions de dommages. GREAT (genomic region enrichment of annotation tool) a été utilisé pour identifier des associations entre les régions liées par Tip60, EPC1 et MBTD1 (558 régions) avec des signatures géniques reliées à des perturbations (MSigDB perturbations). (C) La dépendance de ciblage de TIP60 par MBTD1 est perdue dans des conditions de dommages de l'ADN. La lignée EPC1(1-581), où EPC1 est tronqué donc n'interagit plus avec MBTD1, permet de mettre en évidence l'impact de MBTD1 dans le ciblage du complexe. Les données issues de EPC1(1-581) ont été croisées avec les données en (A). Dans des conditions normales, environ 43% des cibles sont affectées par la perte de MBTD1 du complexe alors que cette proportion atteint moins de 4% après irradiation des cellules (IR; données sans dommages décrites dans le chapitre 3).

Appendice 8:

High conservation of NuA4 structural features and auto-acetylation sites from yeast to human

Dorine Rossetto^{1,2#}, Anne-Lise Steunou^{1,2#}, Johnathan R. Chittuluru³, Karine Jacquet^{1,2}, Leslie Mitchell⁴, Jean-Philippe Lambert⁴, Marie-Eve Lalonde^{1,2}, Myriam Cramet^{1,2}, Vasileia Sapountzi^{1,2}, Mohammed Altaf^{1,2}, Anne-Julie Landry^{1,2}, Daniel Figey⁴, Yannick Doyon^{2,5}, Kristin Baetz⁴, Francisco J. Asturias³ and Jacques Côté^{1,2**}

1. St-Patrick Research Group in Basic Oncology, Laval University Cancer Research Center,
2. Centre de Recherche du Centre Hospitalier Universitaire de Québec (CHU de Québec), Quebec City Qc, Canada;
3. Department of Cell Biology, The Scripps Research Institute, La Jolla, California, USA;
4. Ottawa Institute of Systems Biology, University of Ottawa, Ottawa ON, Canada;
5. Department of Molecular Medicine, Laval University, Quebec City Qc, Canada.

These authors contributed equally to the work

**Corresponding author

tel (418) 525-4444 ext. 15545; email Jacques.Cote@crhdq.ulaval.ca

Running title: Conserved structure and auto-acetylation of NuA4

ABSTRACT

The NuA4 histone acetyltransferase complex is conserved from yeast to human and is a key regulator of gene expression, genome stability and cell fate. The yeast NuA4 cooperates with the ATP-dependent SWR1 complex to regulate transcription through histone H4/H2A acetylation and deposition and acetylation of histone variant H2A.Z. Using electron microscopy imaging and 3D reconstruction, we show that native NuA4 complexes purified from yeast and human cells have similar overall structures. Since the human NuA4 (TIP60-p400) complex corresponds to a physical merge of yeast NuA4 and SWR1 complexes, we also reconstructed the 3D structure of the yeast SWR1 complex, which can be positioned within the human NuA4 volume and allows mapping of functional subcomplexes. Yeast and human NuA4 complexes carry acetylated lysines on multiple subunits *in vivo*, and strongly auto-acetylate several of them *in vitro*. We mapped three acetylation sites within the conserved MYST domain of the yeast Esa1 catalytic subunit. These sites are conserved and modified in almost all members of the MYST family of acetyltransferases. Our data indicate that NuA4 auto-acetylates its subunits *in vivo*, doing so primarily *in cis*, suggesting structural flexibility. We confirmed that acetylation of a lysine located within the active site of yeast and human NuA4 is a primary step for histone acetylation, and also for non-histone substrates. Mutagenesis of other conserved sites within NuA4 subunits suggests roles in fine-tuning complex stability and activity. Altogether, our results indicate that NuA4 structure is highly conserved in eukaryotes including the sites of auto-acetylation, reflecting its conserved essential functions in genome expression and maintenance.

INTRODUCTION

It has long been proposed that specific post-translational modifications of histones within chromatin play critical roles in nuclear functions. Serine/threonine/tyrosine phosphorylation, lysine/arginine methylation and lysine acetylation/ubiquitylation/sumoylation/ADP-ribosylation have been implicated in different aspects of chromatin function in transcription regulation, DNA repair and recombination and epigenetic marking (1, 2). A growing list of factors have been shown to recognize some of these marks on chromatin by means to modulate diverse processes like transcription initiation and elongation, mRNA splicing and DNA damage signaling/checkpoint activation (3). Lysine acetylation on histones has been the most studied modification of chromatin. It has a direct impact on chromatin structure itself as well as the ability to displace specific chromatin-binding factors and can be recognized by bromodomain-containing proteins. Expectedly, acetylation of chromatin on histone lysine residues plays key roles in all major nuclear processes (4, 5).

Histone acetyltransferases have been extensively characterized in a wide array of eukaryotes. They can be divided in at least four families based on their sequence homologies around the catalytic domain, the larger groups being the GNAT and MYST families. Most of these enzymes are part of large multisubunit complexes that often encompass regulatory subunits, protein domains that recognize other histone modifications (e.g. chromo, PHD, PWWP domains) and other enzymatic activities that modify chromatin (e.g. de-ubiquitinase, histone exchanger) (6).

It has become increasingly clear that many histone acetyltransferases (HATs) can also modify substrates other than histones, leading to a new nomenclature identifying them as KATs, lysine acetyltransferases (7). Acetylation of tumor suppressor p53, for example, has been described in several reports and distinct KATs, CBP/p300/KAT3, PCAF/KAT2, Tip60/KAT5 and MOF/KAT8, target different lysines that regulate specific aspects of p53 function in cell cycle arrest, cellular senescence and apoptosis (8). More recently, it was shown that the yeast NuA4 complex, containing Esa1/KAT5, targets specific factors implicated in gluconeogenesis and AMPK/AKT signaling as well as affecting lifespan (9, 10). Yeast and human KAT5 were also shown to regulate DNMT1 stability, septin dynamics, senescence and autophagy by direct acetylation of regulators (11-15).

The yeast NuA4 complex is a 13-subunit assembly that contains Esa1/KAT5, the only HAT essential for cell viability in yeast (reviewed in (16)). NuA4 is responsible for acetylation of H4K5/8/12 and H2A in chromatin and is recruited to promoter regions to stimulate transcription and to DNA damage sites where it plays a role in repair (17-19). Using cryo-electron microscopy, we recently characterized the 3D structure of the NuA4 complex and identified the nucleosome interaction surface (20). Histone acetylation requires minimal contacts between the nucleosome core particle and the Piccolo NuA4 catalytic

subcomplex. Piccolo NuA4 also exists independently in the cell and is responsible for global non-targeted acetylation of histone H4 in chromatin (21-23). Furthermore, NuA4-dependent acetylation of chromatin stimulates deposition of the histone variant H2A.Z at promoters through the bromodomain-containing protein Bdf1 and acetylates H2A.Z N-terminal tail once incorporated into chromatin (19, 24-28).

Noticeably, NuA4 is highly conserved in eukaryotes as purification of human Tip60 identified a complex containing homologs of 12 of the 13 yeast subunits (29). Additional subunits in higher eukaryotes are homologous to components of the yeast SWR1 complex, responsible for H2A.Z deposition (reviewed in (30)). NuA4 and SWR1 have strong functional interactions in yeast (27, 31) and it appears that the human NuA4/TIP60 complex physically links chromatin acetylation and H2A.Z deposition activities (Fig. 1A). A version of the small Piccolo NuA4 complex is also conserved in human cells as we identified a homologous HAT complex responsible for global acetylation of H4 *in vivo*, but containing the related HBO1 enzyme (KAT7) instead of Tip60 (32)(Fig. 1A).

Esa1/Tip60 and HBO1 are part of the MYST-family of acetyltransferases, which also includes Sas2/MOF/KAT8 and Sas3/MOZ/MORF/KAT6 (7, 33). It was recently shown that Esa1 and Sas2/MOF undergo an auto-acetylation step within its catalytic site to enable acetylation of histone substrates (34). Acetylation of this key lysine residue in Tip60 and MOF was suggested to be regulated by the Sirt1 deacetylase in human cells (35-37).

In the present study, we further characterize the structural and functional conservation of the NuA4 acetyltransferase complex from yeast to human. We use highly purified yeast NuA4, yeast SWR1 and human TIP60 complexes to visualize how the respective 3D structures compare to each other. This allowed us to find a striking overall similar structure between yeast and human NuA4, despite the presence of many additional components in the human complex. We could also position the structure of the yeast SWR1 complex within the 3D volume of human NuA4/TIP60, simultaneously identifying other functional subcomplexes. In addition, we found that several subunits within the NuA4/Piccolo NuA4 complexes are acetylated on lysine residues *in vivo* in yeast and human cells. We show that this occurs largely through auto-acetylation *in cis* within the same complex by the catalytic subunit. Within native purified complexes, we show that the previously identified auto-acetylation of the catalytic site is again critical for acetylation of histones/chromatin, and also for auto-acetylation of NuA4 subunits. We mapped additional auto-acetylated sites within Esa1 that are conserved throughout the MYST-family of acetyltransferases. These sites and other ones in NuA4 subunits seem to modulate the activity and stability of the complex. These results demonstrate that NuA4 has highly conserved structural features from yeast to human, as well as regulatory features such as auto-acetylation sites throughout its subunits. This structural and regulatory conservation concurs with its highly conserved function in genome

expression and maintenance. Different auto-acetylation sites within NuA4 vary in their functional importance and serve as efficient means to regulate the complex through the action of deacetylases.

RESULTS

Comparison of NuA4 acetyltransferase complexes from yeast and human cells

Our group has previously demonstrated the extremely high level of subunit conservation between the yeast NuA4 complex and polypeptides co-purifying with the human Tip60 histone acetyltransferase (16, 29, 47). In fact, 12 of the 13 yeast subunits have clear homologs associated with the human complex (Fig. 1). Homologs of drosophila Enhancer of Polycomb, E(Pc), can be efficiently used to affinity-purify yeast (Epl1) and human (EPC1) NuA4 complexes, with high yield and excellent level of purity (Fig. 1B and D). It is now well recognized that several histone acetyltransferases also modify non-histone substrates *in vivo*, often in relation to nutrient sensing/regulation of energy pathways (48). It is therefore notable that several subunits of both yeast and human NuA4 complexes are acetylated on lysine residues *in vivo* (Fig. 1C and D) (35, 49-53)(supplemental Table 1; see also www.phosphosite.org (54)).

In a recent study we characterized the tridimensional structure of the yeast NuA4 complex using single-particle electron microscopy (20). Thousands of images of NuA4 particles preserved in amorphous ice allowed high-resolution refinement of the 3D structure. Additional experiments identified the locations of the picNuA4 catalytic subcomplex and the large ATM-related Tra1 subunit in the NuA4 volume. Since human NuA4 contains 12 homologous subunits, along with several additional ones contributing to a larger overall size, we decided to perform the same type of analysis on our purified fractions from human cells. An average obtained from alignment of stained particle images provides the first look at the human TIP60/NuA4 complex (Fig. 2A and supFig. 1A). It is immediately clear that the large domains described for yeast NuA4 are also present in the human complex. By comparing class averages from yeast NuA4 and TIP60, it becomes apparent that the structural homology between yeast and human complexes is much higher than expected (Fig. 2A and supFig. 1A). 3D reconstruction of the NuA4/TIP60 complex from different class averages of images obtained from particles preserved in stain is shown in Fig. 2B. There is a strikingly similar overall topology observed between the yeast and human complexes even when looking at the 3D volumes from different angles, although TIP60 is clearly larger (Fig. 2B; yeast NuA4 has higher resolution because of cryo-EM). Again, this apparent high degree of structural homology was not expected since the human complex is thought to be a merge of two complexes from yeast, NuA4 and SWR1, adding several additional subunits and mass to the human complex.

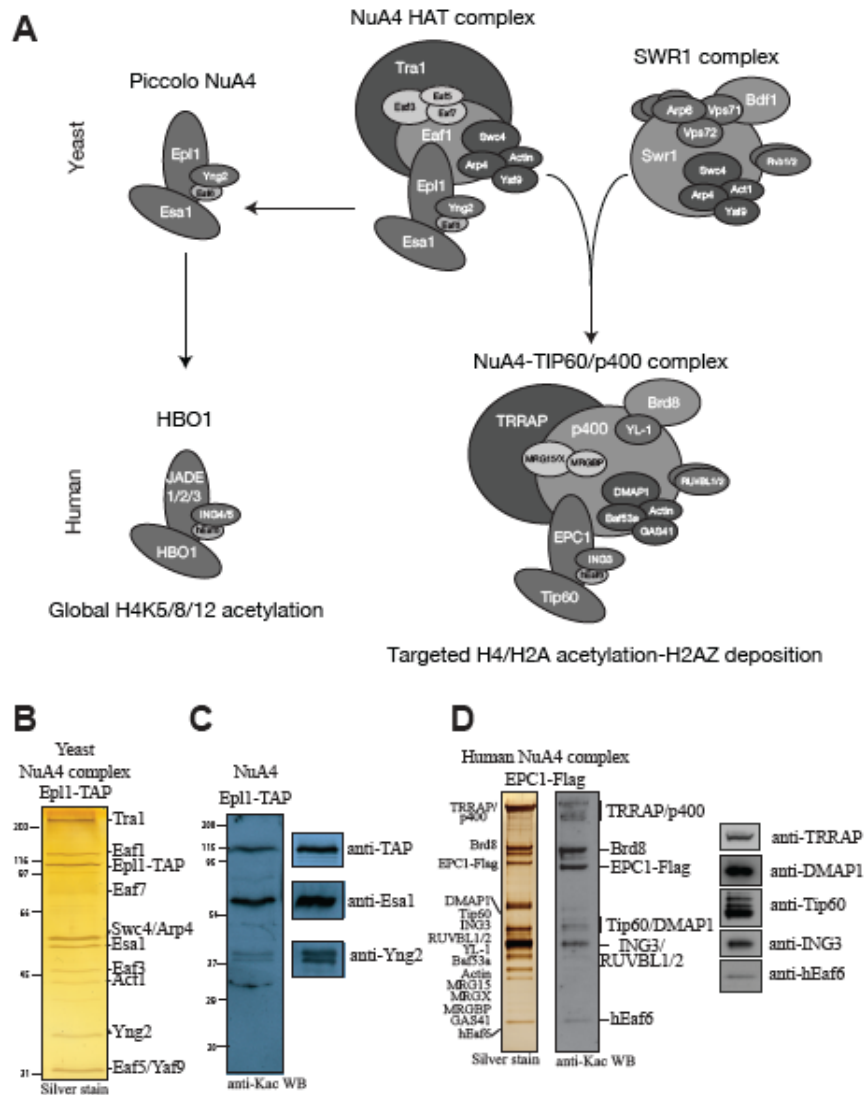


Figure 1. Conservation of NuA4 acetyltransferase complexes from yeast to humans.

A) Drawing presenting the different forms of NuA4 complexes between yeast and human cells. Homologous subunits are kept in similar shapes/locations/shades. Human NuA4 (Tip60-p400) corresponds to an almost exact physical merge of yeast NuA4 and SWR1 complexes. Piccolo NuA4 is a subcomplex of NuA4 in yeast but carries distinct homologous subunits in human cells (HBO1 vs Tip60). **B)** Silver stained gel of purified yeast NuA4 complex using the TAP-tagged Epl1 subunit. Subunits are identified on the right. **C)** Western analysis of purified yeast NuA4 to detect protein acetylated on lysine residues. The three major acetylated bands were confirmed with specific antibodies to be Epl1, Esa1 and Yng2. **D)** Silver stained gel of purified human NuA4 complex using the Flag-tagged EPC1 subunit stably expressed in K562 cells. Subunits are identified on the left. Western analysis as in C is also presented to show subunits carrying acetylated lysine residues.

To gain a better understanding of the structural impact of adding SWR1 homologous components to the human NuA4/TIP60 complex, we used single-particle EM to study the 3D structure of the yeast SWR1 complex. Highly purified and active SWR1 complex was prepared (supFig. 1B) and particles were absorbed onto a continuous amorphous carbon layer and preserved in stain, as for TIP60. Different class averages of image alignments allowed reconstruction of a low resolution map of SWR1 volume (Fig. 2C left, and supFig. 1C). Remarkably, the SWR1 map (green) can be easily docked into the TIP60 volume (gray mesh). Moreover, on the right panel, a segmented version of the TIP60 map is presented in which density corresponding to SWR1 is colored in green while non-SWR1 is colored in blue (Fig. 2C right). This identified two main sub-segments to the non-SWR1 density in TIP60. One matches our previous localization of the Tra1 subunit in yeast NuA4 and therefore can correspond to human TRRAP. The second non-SWR1 sub-segment matches reasonably well the expected location of the picNuA4 catalytic subcomplex, which is formed by Tip60, EPC1, ING3 and hEaf6 in the human complex (see Tra1 and picNuA4 maps in (20)). Our previous map of picNuA4 localization within yeast NuA4, and 3D reconstruction of its association to a nucleosome core particle also correspond precisely to the non-SWR1 volume within the middle of the TIP60 structure (Fig. 2D). Altogether, these results indicate that the overall structure/topology of the NuA4 complex is highly conserved from yeast to human, certainly in part due to the homology detected between 12 subunits. Importantly, the new structural information about the SWR1 complex allows us to locate, in the human complex, the catalytic acetyltransferase domain and also the added ATP-dependent histone exchange module.

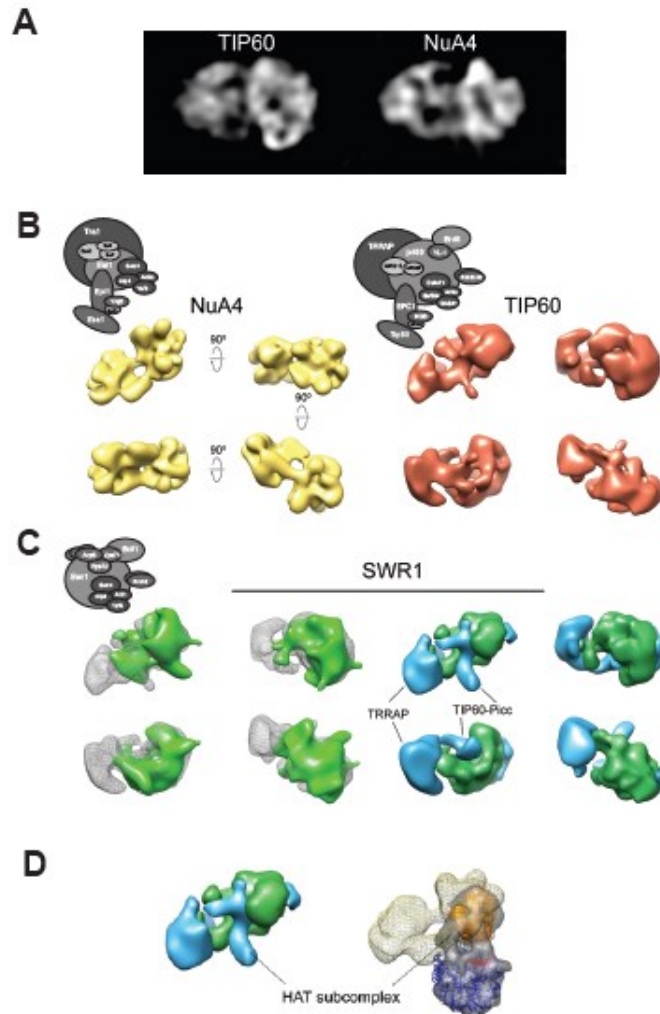


Figure 2. Tridimensional structure of the human TIP60 complex and localization of its acetyltransferase and histone exchange modules.

A) A 2D class average of human TIP60 complex obtained by reference-free alignment of EM images of particles preserved in stain. A similar 2D class average of yeast NuA4 complex is shown for comparison. **B)** Different views of 3D reconstructions of human TIP60 complex obtained using the RCT method (maroon), with corresponding similar views for yeast NuA4 (yellow). The 2D and 3D maps of the human complex both show a structure comprising two large domains joined by thin connections, similar to the yeast complex. **C)** Different views of 3D reconstructions of yeast SWR1 complex obtained using the RCT method (green), and docked in the TIP60 map (gray mesh). On the right is a segmented version of the TIP60 map in which density corresponding to SWR1 (approximately identified by proximity to the docked SWR1 map) is colored green, while non-SWR1 is colored in blue. Putative location of the TRRAP subunit and putative Tip60 HAT module are indicated (based on equivalent locations in the yeast NuA4 map). **D)** Corresponding locations of HAT subcomplexes in human TIP60 and yeast NuA4 complex. The NuA4 image shows the 3D map of the picNuA4 complex bound to a nucleosome and docked in the yeast NuA4 volume (mesh; from (20)).

Subunits of the NuA4 acetyltransferase complex are acetylated *in vivo* and can be autoacetylated *in vitro*

As mentioned in the introduction, yeast Esa1 auto-acetylates itself on a key lysine residue within its catalytic site (K262), a prerequisite step that allows subsequent acetylation of histone substrates (34). The Yng2 subunit of NuA4 is also acetylated on a specific lysine (K170) *in vivo*, a mark deposited by Esa1 and removed by the Rpd3 deacetylase (55). Yng2 is critical to allow the catalytic subunit Esa1 to acetylate histones within the context of chromatin (21). K170ac on Yng2 is important for its own (or complex) stability. Deacetylation of this residue was shown to occur during repair of DNA double-stranded breaks, effectively disrupting the NuA4 complex and allowing deacetylation of chromatin (55). More recently, a “mChIP-KAT-MS” approach showed that several NuA4 subunits were acetylated *in vivo* and can be auto-acetylated *in vitro* (50)(see also supplemental Table 1 (53)). By western blot using different antibodies raised against acetylated lysines, we can detect mainly Epl1, Esa1 and Yng2 on purified NuA4 complex (Fig. 1C). Both Epl1 and Esa1 show stronger signals than Yng2 using this detection method. In fact, detection of Yng2 acetylation was variable using this western approach, often giving very weak or no signal (data not shown, see below). We determined if these Kac signals were regulated by purifying NuA4 from cells grown in different conditions, i.e. in conditions of DNA damage or during disruption of the nutrient-sensing TOR pathway (Fig. 3A). No gross variation can be seen, arguing that acetylation sites detected by this method are not highly regulated in these conditions but are rather constitutively present within NuA4. To determine if NuA4 is responsible for its own acetylation, we incubated the purified complex with or without acetyl-CoA and compared the signals by western blot (Fig. 3B). In these conditions we observe an increase in Kac of Epl1 as well as newly detected bands corresponding to Eaf1 and Eaf3. In contrast, the intensity of Esa1 signal seems to remain mostly unchanged while Yng2 remains undetected. To increase the detection sensitivity for these acetylation signals, we repeated the same assay with radiolabeled acetyl-CoA (Fig. 3C). Using this method, it is apparent that at least 7 subunits of NuA4 become acetylated (lane1). Interestingly, when purified chromatin is added to the reaction, NuA4 ceases the auto-acetylation process and turns its activity towards the nucleosomal histone substrate (lane 2).

Western blot for acetylated lysines on purified NuA4 after incubation with acetyl-CoA in vitro. Detected acetylated subunits are indicated on the right. **C)** Fluorography of acetyltransferase assays using purified yeast NuA4 complex in the absence or presence of 0.5 mg of native nucleosomes. **D)** Sequence homologies between all yeast and human MYST-family acetyltransferases over the conserved MYST domain. The three red arrows indicate the three acetylated lysine residues detected on Esa1 in vivo. The three tick underlined regions correspond to the three critical interfaces for catalysis (cysteine, acetyl-CoA binding and glutamate). Lysine residues that have been found acetylated in vivo in the different MYST proteins are underlined. **E)** Acetylation of Esa1-K262 but not K294/K339 is essential for cell viability. Serial tenfold dilution spot assay of plasmid shuffle experiment with cells containing the indicated vectors in an *esa1* deleted background. After chasing the *URA3* vectors on 5'-FOA, all mutants support growth except *esa1K262R*. Cells were grown at 30°C for 2 to 3 days. **F)** Equivalent expression of the different Esa1 proteins was confirmed by western blot. **G)** Mutation of Esa1 K294 and 338 residues does not generally affect growth, except on formamide-containing media. Spot assay of viable *esa1* lysine mutants in the indicated conditions/drug-containing media.

The Esa1 catalytic subunit is acetylated on 3 conserved lysine residues within the MYST domain

The fact that Esa1 is strongly acetylated on lysine residues in vivo but is a poor substrate for auto-acetylation by native NuA4 in vitro suggests two possibilities: another KAT is responsible for acetylation of Esa1 in vivo; or Esa1 is indeed responsible for its own acetylation but this process is so efficient in physiological conditions that most sites are fully acetylated and cannot be targeted in vitro. To discriminate these two possibilities and to investigate the functional significance of this process, we first decided to map the native acetylated lysine residues on Esa1 by mass spectrometry using purified NuA4 complex. Interestingly, besides the previously reported essential K262 residue (34), two other acetylation sites were mapped within the highly conserved MYST domain of Esa1, on lysines at positions 294 and 339 (Fig. 3D and suppl. Fig. 2). These residues along K262 are conserved in most, if not all, MYST acetyltransferases from yeast to humans and are located in close proximity of critical regions for the enzymatic reaction with acetyl-CoA and histone substrate (56)(tick lines in Fig. 3D). Furthermore, the acetylation of these residues is also strikingly conserved in human Tip60 and several members of the MYST-family of acetyltransferases (underlined in Fig. 3D)(34-37, 52, 57, 58)(www.phosphosite.org (54)).

Acetylation of Esa1 K262, but not K294 and K339, is essential for cell viability

To determine the importance of these acetylated residues on Esa1 or NuA4 function, we mutated each one to an arginine (R), to block acetylation while preserving the positive charge, or to a glutamine (Q), to mimic acetylation. Plasmid shuffling was then used to determine if these mutants could support cell viability since Esa1 is essential. As shown in Figure 3E, and as we previously reported, cells expressing

only *esa1K262R* are non-viable while cells carrying *K262Q* show no growth defect, depicting the critical role of this auto-acetylation site (34). In contrast, *K294* and *K339* mutants can all support wild type growth. These results confirm that acetylation of *Esa1* on lysine 262 is essential for its function in cell viability, which is not the case for the two other acetylation sites within the MYST domain. We also assayed the *Esa1 K294* and *K339* mutants for specific phenotypes in different growth or stress conditions and detected some weak sensitivities, mostly on formamide-containing media where the *K339Q* mutant has clear growth defects (Fig. 3G). Overall, these data show that acetylation of *Esa1 K262* is by far the most important of the three sites mapped by mass spectrometry in the MYST domain, for cell viability.

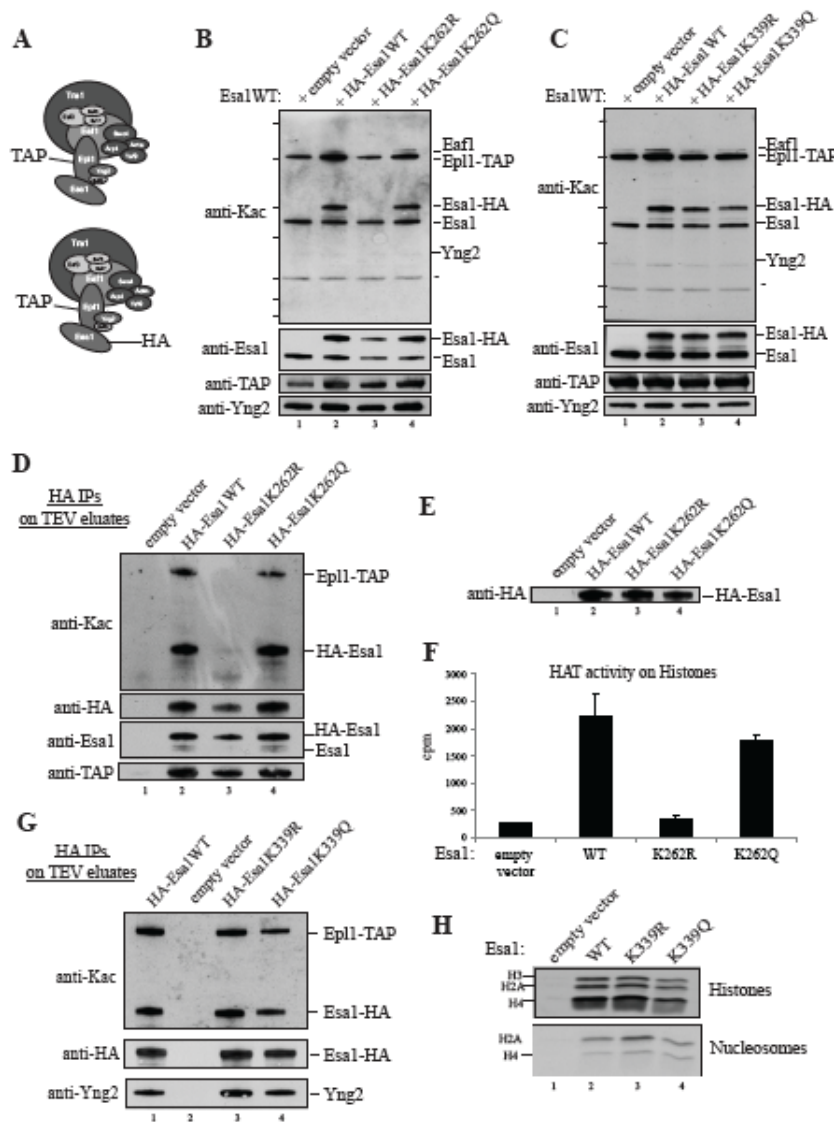


Figure 4. Auto-acetylation of NuA4 subunits occurs in cis and *Esa1-K262ac* is primary to acetylation of any substrate.

A) Drawing depicting the two populations of NuA4 complexes present in these cells before purification (to allow isolation of mutant complex that cannot support cell viability). **B)** Esa1-K262Q is normally auto-acetylated *in vivo* while K262R is not. Western analysis of NuA4 complexes affinity purified with Epl1-TAP and containing both endogenous untagged Esa1 and HA-tagged Esa1, wild type and K262R/Q mutants. Asterisk marks a non-specific band present in the TEV elution. **C)** In contrast to K262, Esa1-K339 is not essential for Esa1 acetylation *in vivo*. TEV fractions from Esa1-K339R/Q substitutions were analyzed as in B. **D)** Western analysis of anti-HA immunoprecipitates from the TEV fractions described in B (Esa1-K262 mutants). The absence of endogenous Esa1 signal indicates the presence of a single Esa1 molecule per NuA4 complex. **E)** Western analysis to show standardization of HA-purified NuA4 complexes for acetyltransferase assays. **F)** Liquid acetyltransferase assay with fractions shown in E using free histones as substrate. Standard errors are based on duplicate assays. **G)** Western analysis as in D for HA-purified Esa1-K339 mutants. **H)** Gel fluorography of acetyltransferase assay with normalized Esa1-K339 fractions from G using free histones or nucleosomes as substrate.

Acetylation of Esa1 K262 is required for acetylation of other lysine residues on the protein *in vivo*

We then wanted to examine the possible effects of the different lysine mutations on NuA4 structure and activity. Since the *esa1K262R* mutation is lethal, we decided to express the various HA-tagged mutant proteins in an untagged wild type Esa1 background. In these conditions, all strains grew similarly and combination with TAP-tagged Epl1 allowed simple purification of the NuA4 complexes through the Epl1 subunit. Fractions were analyzed after the first affinity step, elution with the TEV protease. These elutions contain a mixture of NuA4 complexes harboring wild type untagged Esa1 and either episomally expressed HA-tagged wild type or mutant Esa1 (Fig. 4A). As shown in Figure 4B and C, both forms of Esa1 are expressed at equivalent levels and can be easily separated on gel (lower panels). When the fractions are analyzed for Kac signals, it becomes apparent that the Esa1-K262R mutant protein loses its acetylation (Fig. 4B, lane 3 versus 2). This might suggest that the bulk of physiological Esa1 acetylation detected by western is on the K262 residue. However, this is clearly not the case since the Esa1-K262Q mutant shows a normal level of acetylation (lane 4). Taken together, these results indicate that the initial acetylation of Esa1 K262 is essential for subsequent acetylation of other lysine residues on Esa1, including K294 and K339. Interestingly, it also suggests that the Esa1 subunit cannot be acetylated by another Esa1 molecule *in trans* since the defect on Esa1-K262R is not overcome by the wild type copy of Esa1 in the cells. Finally, these results also demonstrate that acetylation of Esa1 on multiple sites does not affect its association with Epl1/NuA4.

Acetylation of Esa1 K339 may also be an important regulatory modification as it is located adjacent to E338, a key residue in catalysis allowing the transfer of the acetyl group from acetyl-CoA to the lysines on cognate substrates, such as the histone H4 N-terminus (56). In contrast to the K262R

mutant, neither the K339R nor the K339Q mutant have any effect on Esa1 acetylation *in vivo* or on NuA4 complex assembly (Fig. 4C). Altogether these results implicate Esa1 in a physiological auto-acetylation process that requires prior auto-acetylation of K262 *in cis* before subsequent residues can be acetylated. This indicates that the “flip-in” mechanism previously proposed, in which K262 acetylation frees the catalytic glutamate residue (E338) to allow histone substrate binding (34), is also prerequisite for acetylation of non-histone substrates, in this case other lysine residues on Esa1 itself.

NuA4 subunits are auto-acetylated *in cis in vivo* and require Esa1 K262ac

To further analyze the Esa1 mutant-containing NuA4 complexes, we used the TEV-eluted fractions described above to purify the Esa1 mutant proteins using their 6HA epitope tag and perform western-blots and enzymatic assays. By doing so we confirm that the K262 mutants are still stably associated with NuA4 subunits. Notably, we observe that a single Esa1 molecule is present in each NuA4 complex as no significant amount of endogenous Esa1 is detected after the HA affinity step (Fig. 4D and G). Then, we used equal amounts of purified HA-Esa1 in HAT assays and showed that the Esa1-K262R mutant blocks NuA4 acetyltransferase activity towards histones, similar to what was previously described for recombinant Esa1 (34), while the Esa1-K262Q-containing NuA4 retains normal activity (Fig. 4E-F).

Importantly, western-blot analysis of the purified mutant complexes shows that not only Esa1 auto-acetylation is dependent on Esa1-K262ac, but also its ability to acetylate other NuA4 subunits. Epl1 Kac signal is clearly lost in the K262R mutant complex while it retains wild type level in K262Q (Fig. 4D). The same observation applies to Eaf1 and Yng2 subunits whose acetylation signals are lost in K262R but not Q mutant cells (suppl. Fig. 3). These results indicate that, in the cell, the NuA4 complex auto-acetylates a number of its subunits on specific lysine residues. Importantly, we show that it does so *in cis* within a single NuA4 entity as the wild type complexes present in the cell cannot compensate “*in trans*” for the loss of Kac signals on the subunits of the mutant-containing complexes. This demonstrates that the structure of NuA4 must allow a great molecular flexibility in order for the Esa1 catalytic site to effectively reach and modify the different subunits *in cis*. But notably, lysine acetylation on Esa1 K262 must precede any other auto-acetylation events within NuA4. Altogether, these results indicate the absolute requirement of Esa1-K262 to be acetylated for NuA4 to function as an acetyltransferase.

We performed similar experiments with the Esa1-K339 mutants to address its possible effect on the neighboring E338 residue critical for histone modification (56). We speculated that acetylation on K339 might affect the specificity of the acetylation reaction by shifting either substrate or histone tail preference. However, as shown in Figure 4G-H, K339 mutations do not affect Epl1/NuA4 association and

Esa1 (and Epl1) auto-acetylation, as well as acetylation of free histones and nucleosomes that remain essentially unchanged in both R and Q mutant complexes.

Importance and mechanism of NuA4 auto-acetylation is conserved in yeast and human complexes

Most subunits in yeast and human NuA4 complexes are acetylated on lysine residues in vivo (Fig1 C and D) (suppl. Table 1). Furthermore, both Tip60 and HBO1 are acetylated on the lysine residue equivalent to Esa1 K262 (Fig. 3D). To confirm the possibility that these native acetylated lysines are due to auto-acetylation by the MYST enzymes themselves, we performed radiolabeled acetyltransferase assays using TIP60 catalytic subcomplex (Tip60-EPC1-ING3-hEaf6) and HBO1 complex (Fig. 5A, D). These experiments clearly show that both complexes purified from transient transfections can auto-acetylate most of their subunits in vitro.

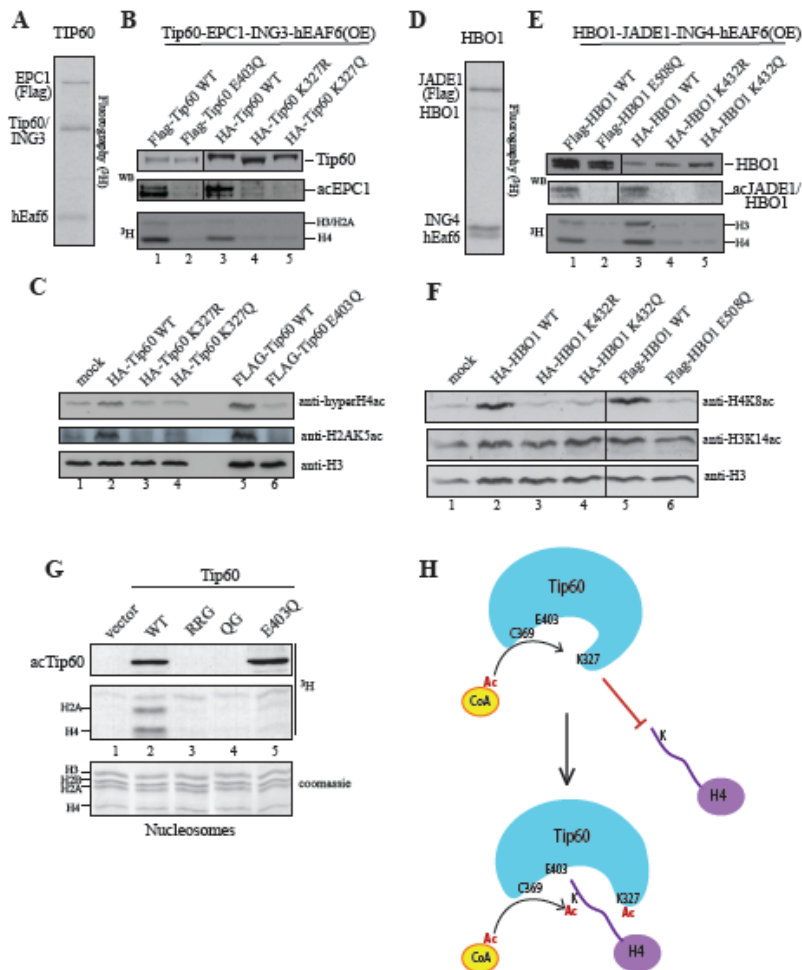


Figure 5. The primary role of lysine auto-acetylation at the active site is conserved in human NuA4 complexes.

A) Gel fluorography of TIP60 catalytic sub-complex purified from transient over-expression of Tip60, ING3, hEaf6 and Flag-EPC1 (purified through the indicated Flag-tagged subunit) and incubated with radioactive acetyl-CoA. Radiolabeled/auto-acetylated subunits are indicated on the left. **B)** Gel fluorography of histone acetyltransferase assay with normalized wild type and mutant TIP60 complexes purified from transient over-expression of the four indicated subunits. The E403Q mutant is used as control, since it is predicted to block acetylation of histone substrate. Western analysis is also shown to demonstrate the loss of auto-acetylation in the mutant complexes. **C)** Western analysis of acid extracted histones from the cells transfected in B to show variation in acetylation of specific histones in vivo. **D-F)** Same experiments as in A-C but using purified HBO1 tetrameric complex. **G)** HAT assay on oligonucleosomes with Tip60 catalytic site mutants purified from transient over-expression and anti-Flag immunoprecipitation. RRG and QG mutant blocks binding to acetyl-CoA while E403Q blocks transfer of the acetyl group to the histone tails. Radioactive detection of Tip60 auto-acetylation is also shown. **H)** Mechanistic model of how Esa1/Tip60/HBO1 enzyme auto-acetylation is required for subsequent acetylation of histone and non-histone substrates. Tip60 and histone H4 tail are shown as an example. Lysine 327 acetylation is required to free glutamate 403 which then can coordinate transfer of the acetyl group to the cognate protein substrate.

We then investigated to what degree the mechanisms we uncovered in yeast NuA4 are conserved in human NuA4 and piccolo NuA4 complexes. We produced mutants corresponding to Esa1-K262R/Q in both the Tip60 and HBO1 acetyltransferases (K327 and K432 respectively). As a control, we also mutated the conserved glutamate residue critical for catalysis equivalent to Esa1-E338Q mutant described in (56) (Tip60 E403 and HBO1 E508). After co-transfections of the subunits to form tetrameric complexes, HA or FLAG immunoprecipitations were analyzed by western blot and tested in histone acetyltransferase assays (Fig. 5B, E). As expected, mutation of the critical residue corresponding to Esa1 E338 abolishes the HAT activity of both HBO1 and Tip60. Interestingly, mutations equivalent to Esa1-K262R also kill HBO1 and Tip60 HAT activity. Moreover, the disappearance of acEPC1 and acJADE1 signals suggests that in vivo acetylation of human NuA4 subunits is also abolished in both K262R and E338Q analogous mutants of Tip60 and HBO1. These results demonstrate that human NuA4 complexes also auto-acetylate their subunits in vivo and that auto-acetylation on a single key lysine residue is again prerequisite to acetylation of other substrates. These observations were confirmed in vivo since acetylation of histones H4/H2A is increased when expressing the wild type complexes but not with the mutants (Fig. 5C, F). On the other hand, it is surprising to see that the equivalent K262Q substitution does not restore wild type acetyltransferase activity as it does for Esa1 (Fig. 5B, C, E and F). We speculate this may be due to slight differences in the 3D structures within the MYST domain, whereby the glutamine substitution in humans does not behave like an acetylated lysine. In addition, the glutamate substitution

mutants also decrease the in vivo acetylation of human NuA4 subunits, indicating that the catalytic role of this residue is also important for modifying non-histone substrates (Fig 5 B and E).

To further understand how MYST enzyme auto-acetylation and cognate protein substrate acetylation is coordinated, we analyzed these two processes in the context of chromatin by studying Tip60 proteins carrying various mutations in the catalytic site (Fig. 5G). As expected, previously described Tip60 mutants that cripple acetyl-CoA binding (RRG and QG (59)) are unable to acetylate chromatin or auto-acetylate themselves in vitro (lanes 3 and 4). On the other hand, the Tip60 E403Q mutant, described in the previous experiment and predicted to block the transfer of the acetyl group to the lysine residues on H4 tail (56), still auto-acetylates itself at wild type levels but fails to modify chromatin (lane 5). These results indicate that Tip60 auto-acetylates itself on lysine 327 through a mechanism different from the one used for histone and non-histone acetylation and does not require substrate binding to occur (Fig. 5H, see discussion).

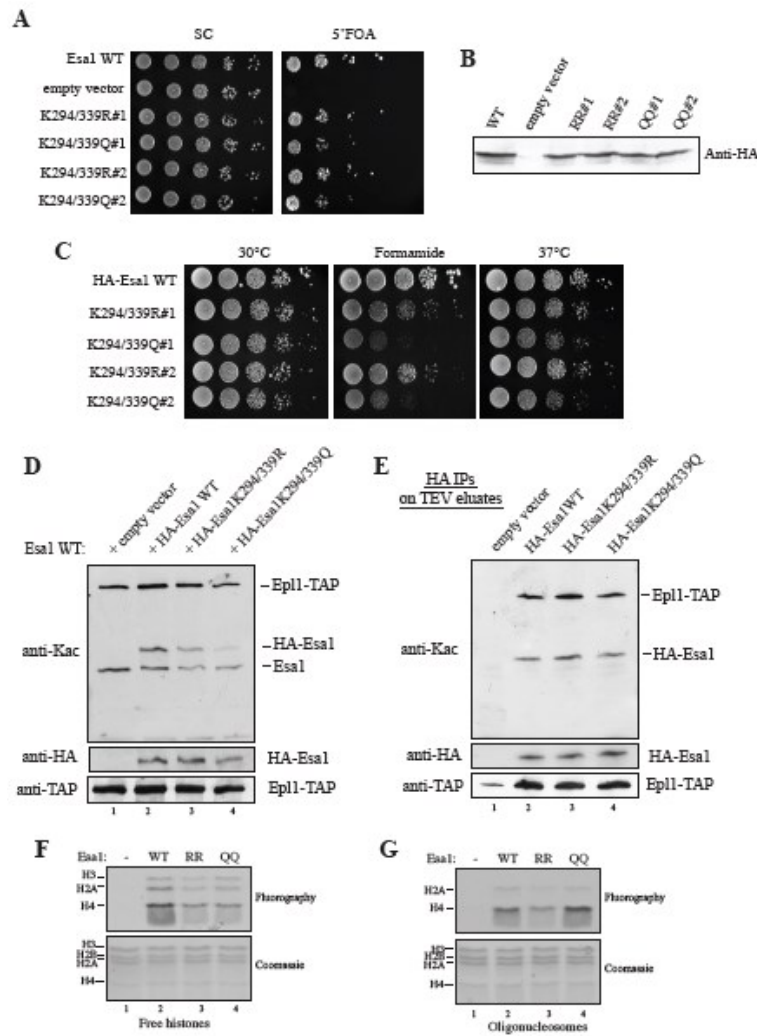


Figure 6. Auto-acetylation of Esa1 K294 and K339 modulate Nua4 function/activity.

A) Double acetylation of Esa1 K294/K339 is not essential for cell viability. Serial tenfold dilution spot assay of plasmid shuffle experiment with cells containing the indicated vectors in an *esa1* deleted background. After chasing the *URA3* vectors on 5'-FOA, all mutants support growth although the double glutamine mutants have a slight delay. **B)** Equivalent expression of the different Esa1 proteins was confirmed by western blot. **C)** Combined mutation of Esa1 K294 and K339 residues affect growth in presence of formamide and cells carrying double glutamine substitution are temperature-sensitive. Spot assay of the indicated *esa1* lysine mutants in the indicated conditions/drug-containing media. **D-E)** Esa1 double mutants for K294/339 are still acetylated and do not affect NuA4 integrity. Western analysis of wild type and mutant NuA4 complexes purified through TEV elution (D) and subsequent HA IP (E), as in figure 4B and D. **F-G)** Gel fluorography of acetyltransferase assay with normalized NuA4 fractions from the HA IPs using free histones (F) or nucleosomes (G) as substrate.

Functional analysis of other acetylation sites in NuA4 subunits

We then proceeded to pursue functional analysis of other acetylation sites that were mapped in NuA4 subunits, most importantly those conserved from yeast to human, in order to uncover new mechanisms of regulation. The highly conserved sites mapped in the MYST domain of Esa1 (K294 and K339), and previously analyzed in isolation, were mutated in combination to determine whether their function is related. K294 and K339 were both mutated into either arginine or glutamine residues. While cell viability and Esa1 protein stability are not affected in these double mutants, clear sensitivities to formamide and temperature are detected, most strongly with the glutamine substitutions (Fig. 6A-C). We then purified the mutant complexes from a wild type background as described in Fig. 4 and found no clear effect on NuA4 assembly or auto-acetylation in vivo (fig. 6D-E). In contrast, HAT activity of the purified complexes on free histones is diminished in both double mutants (Fig. 6F and suppl. Fig. 4A). Surprisingly, while the double arginine substitution also affects activity on chromatin, the glutamine mutant does not and shows even slightly increased activity (Fig. 6G and suppl. Fig. 4B). These results suggest that these two auto-acetylation sites within the MYST domain of Esa1 play a role in substrate recognition and that acetylation/deacetylation of these sites can modulate the modification of chromatin by NuA4 and its function.

Additionally, we pursued investigation of other potentially interesting acetylation sites mapped in NuA4 subunits that include a cluster of 4 lysine residues located on the Epl1 subunit (Fig. 7A; (50, 53)). Interestingly, this cluster is located within the small conserved region that we previously mapped as the binding domain of the ING subunits in yeast and human NuA4 complexes and other MYST HAT complexes (Fig. 7A; (22, 40)). Thus, it was tempting to speculate that acetylation of these residues could influence Yng2 association with NuA4 and therefore its activity. Unexpectedly we found that mutation of these 4 lysine residues has no discernable effect on NuA4 auto-acetylation and assembly since Esa1 and

Epl1 are still acetylated and Yng2 association with Epl1 and Esa1 is not significantly changed (Fig. 7B). HAT activity on free histones also remains unaffected while the acetylation of chromatin is slightly increased by the quadruple lysine-to-glutamine substitution (Fig. 7C-D). It is therefore possible that this cluster of acetylation rather affects the dynamic association of Yng2 to NuA4, decreasing the off-rate, which cannot be clearly detected at the steady state level or in growth assays (Fig. 7B and suppl. Fig. 5).

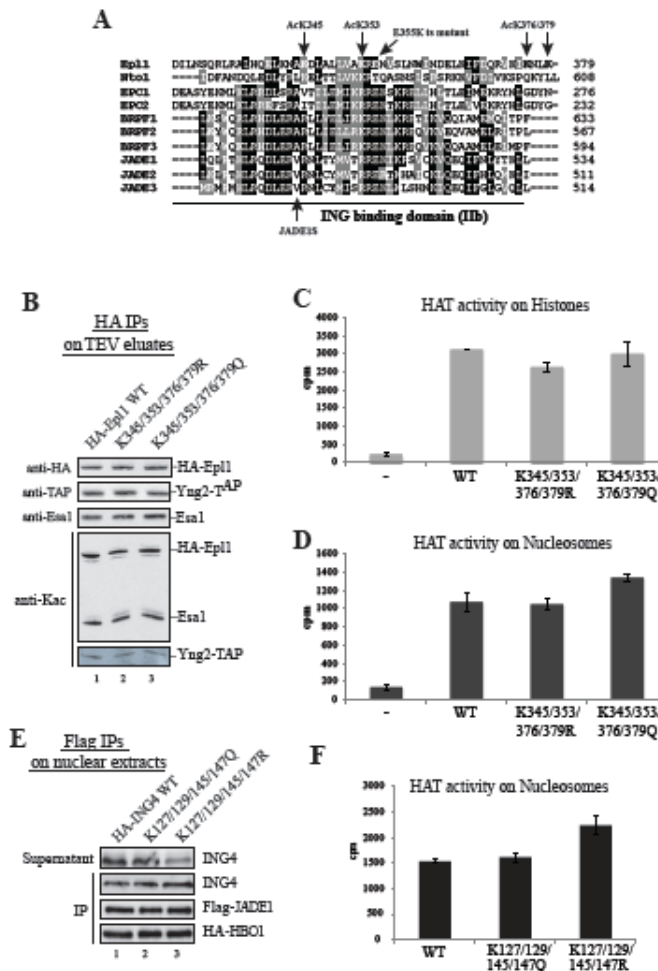


Figure 7. Clusters of acetylation sites on ING-binding domain and ING proteins.

A) Homology of the domains responsible for association of ING subunits with MYST HAT complexes (BRPF1/2/3 and Nto1 are from the MOZ/MORF/NuA3 complexes). Positions of the acetylated lysine residues found in yeast Epl1/NuA4 are shown as well as a known thermosensitive point mutant (55). A JADE1 splice variant that loses ING4 interaction in human HBO1 complex is also indicated (40). **B)** NuA4 complexes with Epl1 quadruple lysine substitutions have no significant loss of Yng2 association. Western analysis of wild type and mutant NuA4 complexes purified through TEV elution and HA IP, as before except that Yng2 is the TAP-tagged subunit and Epl1 is HA-tagged (in cells expressing wild type untagged Epl1). **C-D)** Liquid HAT assays with the normalized wild type and mutant complexes using free

histones (C) or nucleosomes (D) as substrate. **E**) Deacetylation of a cluster of lysine residues on ING4 increases its association with human Piccolo NuA4 complex (HBO1). Anti-Flag IP on nuclear extracts from 293T cells transiently transfected with Flag-JADE1, HA-HBO1, HA-hEaf6 and wild type/mutant forms of HA-ING4 were analyzed by western blot on the flow through and eluted fractions. The quadruple arginine substitution is enriched in the IPed fraction while depleted from the supernatant, when compared to the wild type and glutamine mutant. **F**) Liquid HAT assay as in D with normalized fractions on nucleosomes.

Finally, we turned our focus toward the ING subunit itself. As mentioned above, Yng2 was previously shown to be acetylated on K170 by Esa1, a modification required for Yng2 stability and NuA4 complex integrity (55). It was interesting to note that the homologous region in human ING4, subunit of human Piccolo NuA4, is acetylated in vivo on a cluster of 4 lysine residues (49, 51). In order to examine the relevance of these acetylated residues, we co-expressed human Piccolo NuA4 subunits with wild type or quadruple mutant ING4 in 293T cells and analyzed the complexes after purification. In this case, the glutamine substitutions do not change the complex assembly or activity on chromatin (Fig. 7E-F). On the contrary, the arginine substitutions increase ING4 association with HBO1-JADE1 (Fig. 7E, higher signal in the bound fraction with lower signal in the supernatant, lane 3). This increased binding leads to increased HAT activity on chromatin substrate, while activity on free histones remains constant (Fig. 7F and data not shown). These results imply that acetylation of ING4 may in fact decrease its affinity for NuA4, suggesting a mechanism to regulate NuA4 activity on chromatin. Altogether, our data suggest that acetylation of various NuA4 subunits can modulate the complex stability and activity in distinct ways, fine-tuning its function.

DISCUSSION

In this study, we used single-particle electron microscopy images to reconstruct the first 3D structure of the native TIP60-p400 HAT complex from human cells. This result represents important structural information as Tip60 is a critical regulator of the cell cycle, apoptosis, autophagy, stem cell identity/renewal, DNA methylation, genome stability and is an haplo-insufficient tumor suppressor that is downregulated in a large number of cancers (5, 12, 15, 60-62). Comparing the structure of the human TIP60 complex with that of yeast NuA4 (20) indicates a high degree of conservation not only in subunit homology (16) but also in overall topology. The first 3D structural map of the yeast SWR1 complex also generates important information because of the essential role of this complex in deposition of the H2A.Z histone variant, a key determinant of chromatin structure for gene activation, heterochromatin boundaries and genome stability (reviewed in (30)). Supporting the concept that the human NuA4/TIP60-p400

complex corresponds to a physical merge of two yeast complexes, the 3D reconstruction of the SWR1 complex can be nicely positioned within the volume of the human complex (Fig. 2C). Interestingly, this allowed us to map 3 functional modules in the human NuA4 structure: i) the recruiting interface formed by the large TRRAP subunit, ii) the acetyltransferase catalytic core (picNuA4, Tip60), and iii) the ATP-dependent histone exchange module (p400), which replaces H2A-H2B dimers with H2A.Z-H2B in chromatin.

In addition to the high structural conservation, several large-scale mass spectrometry studies showed that most of NuA4 subunits from yeast and human cells are acetylated on lysine residues (suppl. Table 1). In this study, we showed that several of these are also well conserved between yeast and human subunits. In fact, our data indicate that NuA4 acetylates lysine residues in several of its own subunits both *in vitro* and *in vivo* and that this occurs strictly intra-molecularly within a single complex (Fig. 4 and suppl. Fig. 3). This phenomenon would imply a great molecular flexibility within the multisubunit complex in order for the Esa1 catalytic site to target specific lysines in the distinct subunits. This implication contrasts to some degree with our imaging data obtained by cryo-EM that present an overall stable 3D structure of NuA4 with two large lobes connected together, one of them encompassing the picNuA4 catalytic subcomplex (Esa1-Epl1-Yng2) (20). This apparent discrepancy could be explained by two alternative possibilities. The structural data also indicates that there is very little physical contact between NuA4/picNuA4 and its nucleosome substrate, implying a rapid touch-and-go acetylation reaction that would occur during a transient conformational switch within the complex. Alternatively, it is also possible that subunit acetylation occurs during the assembly of the complex and during transport to the nucleus. Analyzing the roles of the various acetylated lysines on different subunits is of great interest. It has already been proposed that Yng2 acetylation on K170 is important for the stability of the complex and is regulated by the Rpd3 deacetylase during the repair of DNA double-strand breaks (55). In previous collaborative study, we have also demonstrated the critical role of Esa1 auto-acetylation within its catalytic site on K262 (34). This structural work with recombinant Esa1 suggests that the unacetylated lysine effectively blocks catalysis by making contacts with residues in the catalytic site. Acetylation of this residue induces the lysine chain to flip within the structure, thus forming a pocket for cognate lysine substrate acetylation (Fig 5H). Here, we show that auto-acetylation of the K262 residue in Esa1 is essential for cell viability because it is a prerequisite for all subsequent acetylation reactions carried out by the NuA4 complex, either *in cis* within the complex or *in trans* on chromatin substrates. Thus, auto-acetylation of this key site within the catalytic core must precede any other substrate modification by NuA4, including both histone and non-histone substrates. Mammalian NuA4 (Tip60) and Piccolo NuA4 (HBO1) complexes also rely on this initial auto-acetylation step to subsequently modify any substrate,

again demonstrating a high degree of conservation from yeast to human (Fig. 5). On the other hand the glutamine substitution in this case surprisingly does not functionally replace the acetylated lysine, in contrast to Esa1 (Fig. 4). We suggest that slight structural differences between Esa1 and Tip60/HBO1 cause the bulky glutamine residue to continue to interfere with catalysis. Such structural differences can be seen when comparing Esa1 and Tip60 structures around K262/327 (suppl. Fig. 6). Our data comparing the different Tip60 and HBO1 mutants support the model in which the lysine residue must first be auto-acetylated, in order to open the active site and free the glutamate residue for binding of the cognate substrate, either histone or non-histone (Fig. 5H). Most interestingly, acetylation of this key lysine residue in Tip60 was shown to be targeted by the Sirt1 deacetylase, uncovering a powerful mechanism to regulate NuA4 acetyltransferase activity (35, 36)

Functional analyses of other conserved auto-acetylation sites in NuA4 complexes did not provide results as striking as for Esa1 K262ac. However, we show that mutation of the two other conserved sites in Esa1 MYST domain affects cell growth in specific conditions, most strikingly with the acetylation-mimicking glutamine substitutions (Fig. 6). Surprisingly, acetylation of chromatin substrates by NuA4, while significantly decreased by the arginine substitutions, had the opposite effect when replaced with glutamine. Our results suggest that these auxiliary auto-acetylation events in the MYST domain of Esa1 can modulate NuA4 activity on chromatin, and a proper balance is required for normal cell growth. Notably, Esa1 K339 acetylated residue sits next to the key E338 residue required for cognate protein substrate binding, although it is not conserved in HBO1, which instead harbors an unacetylatable arginine residue.

Other acetylation sites suggest regulatory functions at the binding interface of the ING subunits with NuA4 complexes (Fig. 7). ING subunits like Yng2 are crucial to enable NuA4 activity on chromatin substrates *in vitro* and *in vivo* (21, 32). A cluster of acetylated lysines has been found *in vivo* on yeast NuA4 subunit Epl1, precisely within the small conserved domain mapped for association of Yng2 and other ING proteins with MYST HAT complexes (40)(Fig. 7A). Unexpectedly, no clear structural effect or phenotype can be observed even when the 4 residues are mutated, besides a modest increase of activity toward chromatin with the glutamine substitutions. A cluster of lysine acetylations has also been mapped on human ING4, subunit of the HBO1/Piccolo NuA4 complex. Interestingly, this cluster maps in the region homologous to Yng2 K170, an important target of acetylation for Yng2 stability and NuA4 complex integrity (55). In this case, when 4 lysine residues were mutated to arginines, we detected a more stable association of ING4 with the human Piccolo NuA4 complex and increased HAT activity on chromatin. Thus, in contrast to yeast NuA4 and Yng2, deacetylation of these lysines seems to favor complex stability. Further detailed analysis is required to understand this apparent divergent function, which could

be explained in part by the combination of four lysine mutants in the human protein. On the contrary, it is important to point out that the Esa1-K262R-containing NuA4 complex, which has no acetyltransferase activity or detectable acetylated subunits, harbors normal levels of the Yng2 subunit (suppl. Fig. 3). Altogether, these results suggest that clusters of lysine acetylation can modulate the association of key subunits in NuA4, fine-tuning their affinity, the stability of the complex and its function.

Characterizing the functions of auto-acetylation events occurring within NuA4 complexes will be an important avenue of future study. Analysis of putative acetylation-dependent regulation of subunits in the SWR1 module in yeast and human may uncover new mechanisms that control the alteration of chromatin structure and the deposition of histone variants. It will also be relevant to determine if a carbon source/acetyl-CoA rheostat system exists as recently proposed to explain auto-acetylation of subunits within the SAGA acetyltransferase complex (63). Linking metabolism and acetyl-CoA levels to auto-acetylation of the NuA4 complex and cell growth or proliferation requires further testing to analyze Kac signals on NuA4 subunits in a large spectrum of growth conditions. Overall, the high degree of structural and functional conservation that we described between yeast and human NuA4 complexes clearly validates experiments done in different model organisms, and their potential applications for human diseases. Our study underlines how NuA4 functions in cell cycle regulation, genome expression and maintenance are crucial for eukaryotes.

MATERIALS AND METHODS

Yeast strains, plasmid mutagenesis

esa1 and *ep1* K-R/K-Q mutants have been created by PCR-mediated mutagenesis on pSAPE1 and pPHEL plasmids respectively containing wild-type *ESA1* or *EPL1* open reading frame tagged with N-terminal hemagglutinin (HA) epitopes, under the control of the endogenous promoter, with the *LEU2* selection marker (21, 22). Plasmids carrying the mutated forms of *ESA1* were verified by sequencing and transformed into QY118 *MATa his3Δ1 leu2Δ0 ura3Δ0 esa1Δ::KanMX* pLP795 (*ESA1 ARS/CEN URA3*) by standard protocol. This generated strains QY1850, QY1851, QY1854 to 1859, QY2104 and QY2105 (listed in supplementary Table 2). Protein expression of each mutant was verified by Western-blot on whole-cell-extracts prepared in RIPA buffer (50 mM HEPES [pH 7.9], 2 mM EDTA, 0.25 M NaCl, 0.1% SDS, 0.1% DOC, 1% Triton X-100), separated on 10% acrylamide gels, transferred on nitrocellulose membrane and blotted with anti-HA HRP antibody (Roche; 1/1000). To obtain TAP-Epl1 strains also expressing HA-Esa1, pSAPE plasmids corresponding to each mutant were transformed into QY708 *MATa leu2,3-112, ura3-52, his3Δ200, TAP::Epl1-TRP* by standard method generating strains QY1880,

QY1881, QY1884 to 1889, QY2112 and QY2113. Plasmids carrying the mutated forms of *EPL1* were transformed into QY709 *MATa leu2,3-112 ura3-52 his3Δ200 TRP1::Yng2-TAP* or in a *TRP1::Eaf1-TAP epl1Δ::KanMX + pPHEU (3HA-EPL1-WT, ARS/CEN, URA3)* strain by standard protocol.

To generate the haploid *TRP1::Eaf1-TAP epl1Δ::KanMX + pFL38-WT (3HA-EPL1-WT, ARS/CEN, URA3)* strain, the haploid strains QY108 and QY521 were crossed, diploids were sporulated and spores resistant to G418 and viable on synthetic complete medium lacking tryptophan (SC-TRP) and uracil (SC-URA) were selected.

Viability test, plasmid shuffling

Esa1 and *Epl1* K mutants viability test have been performed following standard plasmid shuffling method. Exponentially growing yeast containing the plasmid form of both wild type (*URA3*) and the mutant versions of *ESA1* or *EPL1 (LEU2)* in synthetic complete medium lacking leucine and uracil (SC-LEU-URA) were used in serial tenfold dilution and spotted on synthetic complete SC control plates and SC containing 0.1% of 5'-fluoroorotic acid (FOA) plates. Cells were grown at 30°C for 2 to 4 days. Viable *esa1* and *epl1* mutants were isolated from 0.1%FOA-containing plates and verified on SC-LEU and SC-URA plates. Serial tenfold dilution performed from exponentially growing cells in SC-LEU were then spotted on YPD plates containing either 0.03%MMS, 20nM Rapamycin, 6mM caffeine, 130mM hydroxyurea (HU) or 3% formamide and grown at 30°C or at the indicated temperatures. Photos were taken after 2 to 5 days.

Yeast NuA4 and SWR1 purification

The purification of *Epl1* and *Yng2* associated complexes using the tandem affinity purification (TAP) method was performed as described previously (38). TAP-tagged purification from strains carrying plasmids was prepared from a 250ml culture of cells in minimum medium (SC-LEU), until they reached an OD600 of 2. Cells were lysed in extraction buffer (10mM Tris [pH 8], 350mM NaCl, 10% glycerol, 0.1% NP-40, 2μg of leupeptin and pepstatin A/ml, 5μg of aprotinin/ml, 1mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 10mM Beta-Glycerophosphate and 10mM Sodium Butyrate) using acid-washed glass beads at 4°C. Cell lysates were then clarified by centrifugation (30 minutes at 14000rpm) at 4°C. Total protein extracts were incubated 5-6 hours at 4°C with IgG pre-coupled on Epoxy-DynaBeads (Invitrogen). TAP-associated complexes were eluted using 12.5μl of TEV for 2 hours at 16°C in TEV buffer (10mM Tris [pH 8], 150 mM NaCl, 0.1% NP-40, 0.5mM EDTA, 1 mM DTT, and 10mM Sodium Butyrate), and then incubated with protein A-Sepharose beads (Amersham Bioscience) for 15 min at 4°C to remove IgG antibodies leaking from the IgG-Dynabeads. Finally, to purify HA-*Esa1* or HA-*Epl1* containing TAP purified complexes, HA-immunoprecipitation (HA-IP) using HA-Matrix beads (Roche) was performed on TAP eluted complexes adjusting the NaCl concentration to 300mM final, for 5-6 hours at 4°C. HA-Matrix was washed 3 times

with TEV buffer 300mM NaCl and 2 times with standard TEV Buffer (150mM NaCl). Acetylation of Esa1 and Esa1-associated proteins was tested on TEV eluted complexes separated on a 4-12% gradient pre-cast gel (Invitrogen), transferred onto a nitrocellulose membrane and probed with anti-Acetyl-Lysine ab21623 (Abcam, 1/1000), anti-Esa1 ab4466 (Abcam, 1/2000), anti-TAP (Open Biosystems, 1/3000) and anti-Yng2 (generously provided by Song Tan; 1/500) antibodies. Esa1 acetylation was also confirmed on HA-IP complex using a 10% pre-cast gel (Invitrogen), transferred onto a nitrocellulose membrane and probed with the same antibodies, except the anti-HA HRP form Roche (1/1000 dilution). Histone acetyltransferase assays were performed as described previously (39) using the purified HA complexes, 0.5 μ g of core histones or 0.5 μ g of purified native chromatin (oligonucleosomes from HeLa cells) as substrates, and 0.25 μ Ci/ μ L (4.9 Ci/mmol) of [H3]acetyl-CoA, in 15 μ l final volume of reaction buffer (1X HAT buffer, KCl 20mM, 1mM sodium butyrate) for 30 minutes at 30°C. The reactions were either spotted on P81 Whatman membranes or loaded on 15%-acrylamide gels for fluorography. Purification of the SWR1 complex from an integrated Swr1-3Flag expressing strain was previously described (28).

Mammalian cell culture, plasmids and purification of human NuA4 complexes

Native human TIP60 and HBO1 complexes were purified from stable/transduced cell lines as described previously (32). Details about the construction of the K562 cell line used to purify stably expressed EPC1-3Flag will be published separately (Doyon and Côté, in preparation). In short, an AAVS1 targeting vector expressing EPC1-3Flag-HA-PuroR from a PGK promoter was integrated using Zinc-Finger nuclease technology and clones were selected. There is a F2A peptide auto-cleavage site between the Tags and the PuroR portion of the fusion protein allowing in vivo cleavage after production. For the transiently transfected HBO1 and TIP60 complexes, FLAG- or HA-tagged mammalian expression plasmids for JADE1L, EPC1, ING3/4/5, HBO1, Tip60, and hEAF6 were previously described (29, 40, 41) (Avvakumov, Doyon and Côté, in preparation). Mutations were inserted by PCR using the Quick Change multi site-directed mutagenesis kit (Stratagene). 293T cells (40.10⁶ cells) were co-transfected with 4 μ g of each plasmid (HBO1 and core TIP60 complexes) using the calcium phosphate method. The following antibodies were used for western blots: anti-FLAG M2R HRP conjugate (1:5000) (Sigma), anti-HA HRP conjugate (1:1000) (Roche), anti-acetyl-lysine (1:1000) (Abcam). For affinity purification of transiently expressed protein complexes, 293T cells were harvested 48h post-transfection for complex immunopurification. Cells were washed twice with cold PBS and lysed in 3 volumes of lysis buffer [50mM Tris pH8, 450mM NaCl, 10% glycerol, 1% Triton-X100, 2mM MgCl₂, 0,1mM ZnCl₂, 2mM EDTA, 1mM DTT, 1mM PMSF, 2 μ g/ml leupeptin, 2 μ g/ml pepstatin, 5 μ g/ml aprotinin, 5mM NaF, 100mM Sodium Butyrate, 100mM β -glycerophosphate] on ice for 30 minutes. The cell lysate was then diluted 2 times with

dilution buffer [50mM Tris pH8, 10% glycerol, 1% Triton-X100, 2mM MgCl₂, 0,1mM ZnCl₂, 2mM EDTA, 1mM DTT, 1mM PMSF, 2μg/ml leupeptin, 2μg/ml pepstatin, 5μg/ml aprotinin, 5mM NaF, 100mM Sodium Butyrate, 100mM β-glycerophosphate] and clarified by centrifugation 30 minutes at 12000g. The supernatant (precleared with CL6B sepharose (Sigma)) was then incubated for 5 hours with 100μl of anti-FLAG-M2 agarose affinity gel or HA matrix (Roche) at 4°C . The resin was collected by centrifugation and washed 5 times with 4 ml of wash buffer [50mM Tris pH8, 150mM NaCl, 10% glycerol, 1% Triton-X100, 2mM MgCl₂, 0,1mM ZnCl₂, 2mM EDTA, 1mM DTT, 1mM PMSF, 2μg/ml leupeptin, 2μg/ml pepstatin, 5μg/ml aprotinin, 5mM NaF, 100mM Sodium Butyrate, 100mM β-glycerophosphate]. Both complexes were eluted with 3Flag peptides or kept on beads and were normalized by western blot for HBO1 or TIP60 in comparison to the WT. Analysis of bulk histone acetylation levels was done on acid extracted histones and western blot using antibodies from Millipore (H4 hyperAc (penta), H3K14ac) and Abcam (H4k8ac, H2AK5ac and total H3).

Electron microscopy of yeast SWR1 and human NuA4-TIP60 complexes.

EM samples of NuA4/TIP60 and SWR1 preserved in stain were prepared as described (42). Samples were imaged under low-dose conditions on a field emission gun (FEG) Tecnai F-20 microscope (FEI) (acceleration voltage 120 kV). Images were recorded on a Gatan 4096 × 4096 CCD camera at 50,000 × magnification and ~500 nm underfocus. Two-fold pixel binning resulted in a final pixel size of 4.34 Å. Images of individual NuA4/TIP60 and SWR1 particles (~5,000 for each complex) were selected by hand. Image processing was done using the Spider and SPARX software packages (43, 44). Single-particle images were aligned without a reference and subjected to hierarchical ascendant clustering (45) to produce class averages. An initial SWR1/NuA4 3D maps were calculated by the random conical tilt (RCT) method (46) as described (42). 3D map of yeast NuA4 was described before (20).

Mass spectrometry analysis

The gel band corresponding to the Esa1 subunit of purified NuA4 was excised, in-gel digested with trypsin and analyzed using an LTQ ion-trap mass spectrometer (Thermo) coupled to an 1100 HPLC system (Agilent) as previously described (11). MS/MS spectra matching putative acetylated peptides using the Mascot 2.1.04 database search engine (Matrix Science) were manually verified to insure their validity and the proper assignment of acetylation sites.

Acknowledgments

We are indebted to Ronen Marmorstein for getting us interested in the auto-acetylation of MYST enzymes, which laid the foundation of this study. We are grateful to Nikita Avvakumov for sharing unpublished reagents, purified native chromatin and free histones, Nehmé Saksouk, Christelle Cayrou and Nicolas Lacoste for some fractions used in the study and Sandra Piquet for plasmid construction. This work was supported by grants from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR) to J.C. (MOP-14308/64289), the National Institutes of Health (NIH) to F.J.A., the Canadian Cancer Society Research Institute (grant # 20309) and an Early Researcher Award from the Ontario Government to K.B. K.J. held a PhD studentship from FQRNT, L.M. a CIHR Ph.D. scholarship, J-P.L. an Ontario Graduate Scholarship and a National Science and Engineering Research Council (NSERC) Fellowship and M.-E.L. NSERC/FRQS Ph.D. studentships. D.F., K.B. and J.C. are Canada Research Chairs.

REFERENCES

1. **Zentner GE, Henikoff S.** 2013. Regulation of nucleosome dynamics by histone modifications. *Nat Struct Mol Biol* **20**:259-266.
2. **Suganuma T, Workman JL.** 2011. Signals and combinatorial functions of histone modifications. *Annu Rev Biochem* **80**:473-499.
3. **Musselman CA, Lalonde ME, Cote J, Kutateladze TG.** 2012. Perceiving the epigenetic landscape through histone readers. *Nat Struct Mol Biol* **19**:1218-1227.
4. **Shahbazian MD, Grunstein M.** 2007. Functions of site-specific histone acetylation and deacetylation. *Annu Rev Biochem* **76**:75-100.
5. **Steunou AL, Rossetto D, Cote J.** 2013. Regulating chromatin by histone acetylation, p. in press. *In* Abmayr JLWaSM (ed.), *Fundamentals of Chromatin*. Springer, New York.
6. **Lee KK, Workman JL.** 2007. Histone acetyltransferase complexes: one size doesn't fit all. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**:284-295.
7. **Allis CD, Berger SL, Cote J, Dent S, Jenuwien T, Kouzarides T, Pillus L, Reinberg D, Shi Y, Shiekhattar R, Shilatifard A, Workman J, Zhang Y.** 2007. New nomenclature for chromatin-modifying enzymes. *Cell* **131**:633-636.
8. **Brooks CL, Gu W.** 2011. The impact of acetylation and deacetylation on the p53 pathway. *Protein Cell* **2**:456-462.
9. **Lin YY, Lu JY, Zhang J, Walter W, Dang W, Wan J, Tao SC, Qian J, Zhao Y, Boeke JD, Berger SL, Zhu H.** 2009. Protein acetylation microarray reveals that NuA4 controls key metabolic target regulating gluconeogenesis. *Cell* **136**:1073-1084.

10. **Lu JY, Lin YY, Sheu JC, Wu JT, Lee FJ, Chen Y, Lin MI, Chiang FT, Tai TY, Berger SL, Zhao Y, Tsai KS, Zhu H, Chuang LM, Boeke JD.** 2011. Acetylation of yeast AMPK controls intrinsic aging independently of caloric restriction. *Cell* **146**:969-979.
11. **Mitchell L, Lau A, Lambert JP, Zhou H, Fong Y, Couture JF, Figeys D, Baetz K.** 2011. Regulation of septin dynamics by the *Saccharomyces cerevisiae* lysine acetyltransferase NuA4. *PLoS one* **6**:e25336.
12. **Du Z, Song J, Wang Y, Zhao Y, Guda K, Yang S, Kao HY, Xu Y, Willis J, Markowitz SD, Sedwick D, Ewing RM, Wang Z.** 2010. DNMT1 stability is regulated by proteins coordinating deubiquitination and acetylation-driven ubiquitination. *Sci Signal* **3**:ra80.
13. **Yi C, Ma M, Ran L, Zheng J, Tong J, Zhu J, Ma C, Sun Y, Zhang S, Feng W, Zhu L, Le Y, Gong X, Yan X, Hong B, Jiang FJ, Xie Z, Miao D, Deng H, Yu L.** 2012. Function and molecular mechanism of acetylation in autophagy regulation. *Science (New York, N.Y)* **336**:474-477.
14. **Zheng H, Seit-Nebi A, Han X, Aslanian A, Tat J, Liao R, Yates JR, 3rd, Sun P.** 2013. A Posttranslational Modification Cascade Involving p38, Tip60, and PRAK Mediates Oncogene-Induced Senescence. *Molecular cell* **50**:699-710.
15. **Lin SY, Li TY, Liu Q, Zhang C, Li X, Chen Y, Zhang SM, Lian G, Ruan K, Wang Z, Zhang CS, Chien KY, Wu J, Li Q, Han J, Lin SC.** 2012. GSK3-TIP60-ULK1 signaling pathway links growth factor deprivation to autophagy. *Science (New York, N.Y)* **336**:477-481.
16. **Doyon Y, Cote J.** 2004. The highly conserved and multifunctional NuA4 HAT complex. *Curr Opin Genet Dev* **14**:147-154.
17. **Downs JA, Allard S, Jobin-Robitaille O, Javaheri A, Auger A, Bouchard N, Kron SJ, Jackson SP, Cote J.** 2004. Binding of chromatin-modifying activities to phosphorylated histone H2A at DNA damage sites. *Molecular cell* **16**:979-990.
18. **Robert F, Pokholok DK, Hannett NM, Rinaldi NJ, Chandy M, Rolfe A, Workman JL, Gifford DK, Young RA.** 2004. Global position and recruitment of HATs and HDACs in the yeast genome. *Molecular cell* **16**:199-209.
19. **Durant M, Pugh BF.** 2007. NuA4-directed chromatin transactions throughout the *Saccharomyces cerevisiae* genome. *Molecular and cellular biology* **27**:5327-5335.
20. **Chittuluru JR, Chaban Y, Monnet-Saksouk J, Carrozza MJ, Sapountzi V, Selleck W, Huang J, Utley RT, Cramet M, Allard S, Cai G, Workman JL, Fried MG, Tan S, Cote J, Asturias FJ.** 2011. Structure and nucleosome interaction of the yeast NuA4 and Piccolo-NuA4 histone acetyltransferase complexes. *Nat Struct Mol Biol* **18**:1196-1203.

21. **Boudreault AA, Cronier D, Selleck W, Lacoste N, Utley RT, Allard S, Savard J, Lane WS, Tan S, Cote J.** 2003. Yeast enhancer of polycomb defines global Esa1-dependent acetylation of chromatin. *Genes & development* **17**:1415-1428.
22. **Selleck W, Fortin I, Sermwittayawong D, Cote J, Tan S.** 2005. The *Saccharomyces cerevisiae* Piccolo NuA4 histone acetyltransferase complex requires the Enhancer of Polycomb A domain and chromodomain to acetylate nucleosomes. *Molecular and cellular biology* **25**:5535-5542.
23. **Friis RM, Wu BP, Reinke SN, Hockman DJ, Sykes BD, Schultz MC.** 2009. A glycolytic burst drives glucose induction of global histone acetylation by picNuA4 and SAGA. *Nucleic Acids Res* **37**:3969-3980.
24. **Millar CB, Xu F, Zhang K, Grunstein M.** 2006. Acetylation of H2AZ Lys 14 is associated with genome-wide gene activity in yeast. *Genes & development* **20**:711-722.
25. **Keogh MC, Mennella TA, Sawa C, Berthelet S, Krogan NJ, Wolek A, Podolny V, Carpenter LR, Greenblatt JF, Baetz K, Buratowski S.** 2006. The *Saccharomyces cerevisiae* histone H2A variant Htz1 is acetylated by NuA4. *Genes & development* **20**:660-665.
26. **Babiarz JE, Halley JE, Rine J.** 2006. Telomeric heterochromatin boundaries require NuA4-dependent acetylation of histone variant H2A.Z in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes & development* **20**:700-710.
27. **Auger A, Galarneau L, Altaf M, Nourani A, Doyon Y, Utley RT, Cronier D, Allard S, Cote J.** 2008. Eaf1 is the platform for NuA4 molecular assembly that evolutionarily links chromatin acetylation to ATP-dependent exchange of histone H2A variants. *Molecular and cellular biology* **28**:2257-2270.
28. **Altaf M, Auger A, Monnet-Saksouk J, Brodeur J, Piquet S, Cramet M, Bouchard N, Lacoste N, Utley RT, Gaudreau L, Cote J.** 2010. NuA4-dependent acetylation of nucleosomal histones H4 and H2A directly stimulates incorporation of H2A.Z by the SWR1 complex. *J Biol Chem* **285**:15966-15977.
29. **Doyon Y, Selleck W, Lane WS, Tan S, Cote J.** 2004. Structural and functional conservation of the NuA4 histone acetyltransferase complex from yeast to humans. *Molecular and cellular biology* **24**:1884-1896.
30. **Billon P, Cote J.** 2012. Precise deposition of histone H2A.Z in chromatin for genome expression and maintenance. *Biochimica et biophysica acta* **1819**:290-302.
31. **Krogan NJ, Baetz K, Keogh MC, Datta N, Sawa C, Kwok TC, Thompson NJ, Davey MG, Pootoolal J, Hughes TR, Emili A, Buratowski S, Hieter P, Greenblatt JF.** 2004. Regulation of

- chromosome stability by the histone H2A variant Htz1, the Swr1 chromatin remodeling complex, and the histone acetyltransferase NuA4. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**:13513-13518.
32. **Doyon Y, Cayrou C, Ullah M, Landry AJ, Cote V, Selleck W, Lane WS, Tan S, Yang XJ, Cote J.** 2006. ING tumor suppressor proteins are critical regulators of chromatin acetylation required for genome expression and perpetuation. *Molecular cell* **21**:51-64.
 33. **Avvakumov N, Cote J.** 2007. The MYST family of histone acetyltransferases and their intimate links to cancer. *Oncogene* **26**:5395-5407.
 34. **Yuan H, Rossetto D, Mellert H, Dang W, Srinivasan M, Johnson J, Hodawadekar S, Ding EC, Speicher K, Abshiru N, Perry R, Wu J, Yang C, Zheng YG, Speicher DW, Thibault P, Verreault A, Johnson FB, Berger SL, Sternglanz R, McMahon SB, Cote J, Marmorstein R.** 2012. MYST protein acetyltransferase activity requires active site lysine autoacetylation. *The EMBO journal* **31**:58-70.
 35. **Peng L, Ling H, Yuan Z, Fang B, Bloom G, Fukasawa K, Koomen J, Chen J, Lane WS, Seto E.** 2012. SIRT1 negatively regulates the activities, functions, and protein levels of hMOF and TIP60. *Molecular and cellular biology* **32**:2823-2836.
 36. **Wang J, Chen J.** 2010. SIRT1 regulates autoacetylation and histone acetyltransferase activity of TIP60. *J Biol Chem* **285**:11458-11464.
 37. **Lu L, Li L, Lv X, Wu XS, Liu DP, Liang CC.** 2011. Modulations of hMOF autoacetylation by SIRT1 regulate hMOF recruitment and activities on the chromatin. *Cell Res* **21**:1182-1195.
 38. **Puig O, Caspary F, Rigaut G, Rutz B, Bouveret E, Bragado-Nilsson E, Wilm M, Seraphin B.** 2001. The tandem affinity purification (TAP) method: a general procedure of protein complex purification. *Methods* **24**:218-229.
 39. **Utley RT, Lacoste N, Jobin-Robitaille O, Allard S, Cote J.** 2005. Regulation of NuA4 histone acetyltransferase activity in transcription and DNA repair by phosphorylation of histone H4. *Molecular and cellular biology* **25**:8179-8190.
 40. **Avvakumov N, Lalonde ME, Saksouk N, Paquet E, Glass KC, Landry AJ, Doyon Y, Cayrou C, Robitaille GA, Richard DE, Yang XJ, Kutateladze TG, Cote J.** 2012. Conserved Molecular Interactions within the HBO1 Acetyltransferase Complexes Regulate Cell Proliferation. *Molecular and cellular biology* **32**:689-703.
 41. **Saksouk N, Avvakumov N, Champagne KS, Hung T, Doyon Y, Cayrou C, Paquet E, Ullah M, Landry AJ, Cote V, Yang XJ, Gozani O, Kutateladze TG, Cote J.** 2009. HBO1 HAT complexes target chromatin throughout gene coding regions via multiple PHD finger interactions with histone H3 tail. *Molecular cell* **33**:257-265.

42. **Chaban Y, Ezeokonkwo C, Chung WH, Zhang F, Kornberg RD, Maier-Davis B, Lorch Y, Asturias FJ.** 2008. Structure of a RSC-nucleosome complex and insights into chromatin remodeling. *Nat Struct Mol Biol* **15**:1272-1277.
43. **Frank J, Radermacher M, Penczek P, Zhu J, Li Y, Ladjadj M, Leith A.** 1996. SPIDER and WEB: processing and visualization of images in 3D electron microscopy and related fields. *Journal of structural biology* **116**:190-199.
44. **Hohn M, Tang G, Goodyear G, Baldwin PR, Huang Z, Penczek PA, Yang C, Glaeser RM, Adams PD, Ludtke SJ.** 2007. SPARX, a new environment for Cryo-EM image processing. *Journal of structural biology* **157**:47-55.
45. **Frank J.** 1990. Classification of macromolecular assemblies studied as 'single particles'. *Quarterly reviews of biophysics* **23**:281-329.
46. **Radermacher M, Wagenknecht T, Verschoor A, Frank J.** 1987. Three-dimensional reconstruction from a single-exposure, random conical tilt series applied to the 50S ribosomal subunit of *Escherichia coli*. *Journal of microscopy* **146**:113-136.
47. **Cai Y, Jin J, Tomomori-Sato C, Sato S, Sorokina I, Parmely TJ, Conaway RC, Conaway JW.** 2003. Identification of new subunits of the multiprotein mammalian TRRAP/TIP60-containing histone acetyltransferase complex. *J Biol Chem* **278**:42733-42736.
48. **Sapountzi V, Cote J.** 2011. MYST-family histone acetyltransferases: beyond chromatin. *Cell Mol Life Sci* **68**:1147-1156.
49. **Choudhary C, Kumar C, Gnäd F, Nielsen ML, Rehman M, Walther TC, Olsen JV, Mann M.** 2009. Lysine acetylation targets protein complexes and co-regulates major cellular functions. *Science (New York, N.Y)* **325**:834-840.
50. **Mitchell L, Huard S, Cotrut M, Pourhanifteh-Lemeri R, Steunou AL, Hamza A, Lambert JP, Zhou H, Ning Z, Basu A, Cote J, Figeys DA, Baetz K.** 2013. mChIP-KAT-MS, a method to map protein interactions and acetylation sites for lysine acetyltransferases. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**:E1641-1650.
51. **Kim SC, Sprung R, Chen Y, Xu Y, Ball H, Pei J, Cheng T, Kho Y, Xiao H, Xiao L, Grishin NV, White M, Yang XJ, Zhao Y.** 2006. Substrate and functional diversity of lysine acetylation revealed by a proteomics survey. *Molecular cell* **23**:607-618.
52. **Beli P, Lukashchuk N, Wagner SA, Weinert BT, Olsen JV, Baskcomb L, Mann M, Jackson SP, Choudhary C.** 2012. Proteomic investigations reveal a role for RNA processing factor THRAP3 in the DNA damage response. *Molecular cell* **46**:212-225.

53. **Henriksen P, Wagner SA, Weinert BT, Sharma S, Bacinskaja G, Rehman M, Juffer AH, Walther TC, Lisby M, Choudhary C.** 2012. Proteome-wide analysis of lysine acetylation suggests its broad regulatory scope in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular & cellular proteomics* : MCP **11**:1510-1522.
54. **Hornbeck PV, Kornhauser JM, Tkachev S, Zhang B, Skrzypek E, Murray B, Latham V, Sullivan M.** 2012. PhosphoSitePlus: a comprehensive resource for investigating the structure and function of experimentally determined post-translational modifications in man and mouse. *Nucleic Acids Res* **40**:D261-270.
55. **Lin YY, Qi Y, Lu JY, Pan X, Yuan DS, Zhao Y, Bader JS, Boeke JD.** 2008. A comprehensive synthetic genetic interaction network governing yeast histone acetylation and deacetylation. *Genes & development* **22**:2062-2074.
56. **Yan Y, Harper S, Speicher DW, Marmorstein R.** 2002. The catalytic mechanism of the ESA1 histone acetyltransferase involves a self-acetylated intermediate. *Nat Struct Biol* **9**:862-869.
57. **Sun B, Guo S, Tang Q, Li C, Zeng R, Xiong Z, Zhong C, Ding J.** 2011. Regulation of the histone acetyltransferase activity of hMOF via autoacetylation of Lys274. *Cell Res* **21**:1262-1266.
58. **Yang C, Wu J, Zheng YG.** 2012. Function of the active site lysine autoacetylation in Tip60 catalysis. *PloS one* **7**:e32886.
59. **Ikura T, Ogryzko VV, Grigoriev M, Groisman R, Wang J, Horikoshi M, Scully R, Qin J, Nakatani Y.** 2000. Involvement of the TIP60 histone acetylase complex in DNA repair and apoptosis. *Cell* **102**:463-473.
60. **Squatrito M, Gorrini C, Amati B.** 2006. Tip60 in DNA damage response and growth control: many tricks in one HAT. *Trends Cell Biol* **16**:433-442.
61. **Fazio TG, Huff JT, Panning B.** 2008. An RNAi screen of chromatin proteins identifies Tip60-p400 as a regulator of embryonic stem cell identity. *Cell* **134**:162-174.
62. **Rossetto D, Truman AW, Kron SJ, Cote J.** 2010. Epigenetic modifications in double-strand break DNA damage signaling and repair. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **16**:4543-4552.
63. **Cai L, Sutter BM, Li B, Tu BP.** 2011. Acetyl-CoA induces cell growth and proliferation by promoting the acetylation of histones at growth genes. *Molecular cell* **42**:426-437.

Appendice 9:
DNA repair: chromatin remodeling without H2AZ?

Karine Jacquet and Jacques Côté*

St-Patrick Research Group in Basic Oncology, Laval University Cancer Research Center,
Centre de Recherche du Centre Hospitalier Universitaire de Québec (CHU de Québec), Quebec City Qc,
Canada;

*Corresponding author

tel (418) 525-4444 ext. 15545; email Jacques.Cote@crhdq.ulaval.ca

DNA repair: Chromatin remodeling without H2A.Z?

Comment on: Taty-Taty GC, et al. *Cell Cycle* 2014; 13:399–407; PMID:24240188; <http://dx.doi.org/10.4161/cc.27143>

Karine Jacquet and Jacques Côté*; Laval University Cancer Research Center; CHU de Québec Research Center-Oncology; Québec City Québec, Canada;

*Correspondence to: jacques.cote@crhdq.ulaval.ca; <http://dx.doi.org/10.4161/cc.28383>

Chromatin is a highly dynamic structure regulated by different factors, such as ATP-dependent remodeling complexes, incorporation of histone variants, post-translational modifications, and histones chaperones. During the DNA damage response, the chromatin architecture must be transiently and locally modified in order to regulate access to the DNA lesion. Chromatin remodeling at double-strand breaks is necessary, and the recruitment of remodeler complexes such as INO80, SWI/SNF-BRG1-RSC, FUN30, as well as the SWR1/p400 has been observed. Post-translational modifications of histones, such as phosphorylation, ubiquitination, and acetylation at sites of damage are also important to regulate the subsequent repair and cell cycle checkpoint activation/release. Moreover the H2A variant H2A.X is a well-documented player whose phosphorylation is a primary event to initiate the signaling cascade and stabilize the association of multiple factors.

H2A.Z is another H2A variant, incorporated by SWR1 in yeast and SRCAP or p400 in higher eukaryotes. H2A.Z has been proposed to create a region of “poised” chromatin near the transcription start site of genes, facilitating nucleosome disruption during gene activation, in part through its acetylation. It is also important for the establishment of heterochromatin domains near centromeres and at telomeres. H2A.Z is essential in higher eukaryotes, while deletion of the yeast homolog Htz1 is viable. The NuA4 acetyltransferase complex cooperates with SWR1 in targeting chromatin and Htz1 at promoter regions.¹ *Drosophila* homolog H2Av, which functionally represents both H2A.X and H2A.Z, is acetylated and exchanged on chromatin by the TIP60/p400 complex, equivalent to a physical merge of yeast NuA4 and SWR1.¹ Yeast H2A.Z impacts DNA repair by homologous recombination, as sumoylated-Htz1 is transiently incorporated at DNA damage, where it regulates DNA end resection and RAD51 nucleofilament formation.¹ Several groups have attempted to

transpose a similar model in mammals, but the conclusions remain unclear.

p400 is recruited to DNA double-strand breaks (DSBs), at least in part within the hNuA4/TIP60 acetyltransferase complex. It has been proposed to function with Tip60 for the acetylation and ubiquitination of chromatin and subsequent recruitment of BRCA1 and 53BP1 to the break.² Recent work indicates that p400 is required for DNA repair by Rad51-mediated homologous recombination (HR).³ In parallel, another study proposed that H2A.Z is transiently exchanged onto nucleosomes at the break by p400.⁴ As previously argued for p400, H2A.Z also appears to regulate both acetylation and ubiquitination of chromatin. It was suggested that H2A.Z deposition is important for BRCA1 and Ku70/80 loading and restricts DNA end resection. Thus, H2A.Z could impact the choice between homologous recombination and non-homologous end joining through regulation of CtIP. In contrast to these findings, Canitrot, Trouche, and colleagues now present divergent results.⁵ Their data indicate that while H2A.Z is crucial for cell proliferation, viability, and cell cycle regulation, no incorporation is seen at DSBs, as tested by immunofluorescence and chromatin immunoprecipitation. The authors suggest that cell line dependency and p53 status are key issues that may explain the contradictory results, highlighting the bias of cancer vs. immortalized cell lines. They propose that p400 function at the break is independent of H2A.Z incorporation and rather occurs mostly through the TIP60 complex and the acetylation of chromatin. This hypothesis concurs with the actual model, in which acetylation of H4 by TIP60 blocks 53BP1 recruitment to favor HR.⁶ Previous reports also implicate the TIP60-p400 complex in acetylation and exchange of phospho-H2A.X at the break.¹

In the chromatin field, H2A.Z has been a focal point of debate because of reported opposing functions. It must be considered that the role of H2A.Z may be restricted to a

certain type of DNA damage, and data about its transient recruitment could be difficult to evaluate. The different studies underline the caveats of studying a factor that affects various cellular processes, most importantly cell proliferation, leading to potential indirect effects, as, in fact, it was proposed for p400 itself.⁷ It is also important to consider that the interpretation of ChIP experiments is dependent on the quality of the antibodies and the use of appropriate controls and normalization. Notably ChIP experiments at DSBs should be carefully handled because of (1) the resection process that obviously affects nucleosome occupancy/DNA accessibility for extraction/shearing and (2) the use of reporter systems that depend on cassettes driven by a strong promoter incorporated within the genome. More work is apparently required to elucidate the exact role of H2A.Z/TIP60-p400 during the DNA damage response and the function of H2A.Z eviction or incorporation near DSBs. This is certainly an important question that is raised again by work just published in *Nature* showing that histone chaperon ANP32E associates with TIP60-p400 to help remove H2A.Z from chromatin.⁸

References

1. Billon P, et al. *Biochim Biophys Acta* 2013; 1819:290-302; PMID:24459731; <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbagra.2011.10.004>
2. Xu Y, et al. *J Cell Biol* 2010; 191:31-43; PMID:20876283; <http://dx.doi.org/10.1083/jcb.201001160>
3. Courilleau C, et al. *J Cell Biol* 2012; 199:1067-81; PMID:23266955; <http://dx.doi.org/10.1083/jcb.201205059>
4. Xu Y, et al. *Mol Cell* 2012; 48:723-33; PMID:23122415; <http://dx.doi.org/10.1016/j.molcel.2012.09.026>
5. Taty-Taty GC, et al. *Cell Cycle* 2013; 13
6. Tang J, et al. *Nat Struct Mol Biol* 2013; 20:317-25; PMID:23377543; <http://dx.doi.org/10.1038/nsmb.2499>
7. Mattera L, et al. *PLoS Genet* 2010; 6:e1000983; PMID:20548951; <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pgen.1000983>
8. Obri A, et al. *Nature* 2014; 505:648-53; PMID:24463511; <http://dx.doi.org/10.1038/nature12922>