

Université de Montréal

**Homéostasie des histones en réponse au dommage à l'ADN
et étude d'inhibiteurs de désacétylases d'importance clinique**

par

Valérie Villeneuve

**Unité académique de biologie moléculaire,
option biologie des systèmes
Institut de Recherche en Immunologie et en Cancérologie (IRIC)
Programmes de biologie moléculaire
Faculté de Médecine**

Thèse présentée à la Faculté de Médecine
en vue de l'obtention du grade de *Philosophiæ Doctor* (Ph.D.)
en biologie moléculaire option biologie des systèmes

20 Janvier 2015

© Valérie Villeneuve, 2015

Résumé

La chromatine possède une plasticité complexe et essentielle pour répondre à différents mécanismes cellulaires fondamentaux tels la réplication, la transcription et la réparation de l'ADN. Les histones sont les constituants essentiels de la formation des nucléosomes qui assurent le bon fonctionnement cellulaire d'où l'intérêt de cette thèse d'y porter une attention particulière. Un dysfonctionnement de la chromatine est souvent associé à l'émergence du cancer.

Le chapitre II de cette thèse focalise sur la répression transcriptionnelle des gènes d'histones par le complexe HIR (HIstone gene Repressor) en réponse au dommage à l'ADN chez *Saccharomyces cerevisiae*. Lors de dommage à l'ADN en début de phase S, les kinases du point de contrôle Mec1, Tel1 et Rad53 s'assurent de bloquer les origines tardives de réplication pour limiter le nombre de collisions potentiellement mutagéniques ou cytotoxiques entre les ADN polymérase et les lésions persistantes dans l'ADN. Lorsque la synthèse totale d'ADN est soudainement ralentie par le point de contrôle, l'accumulation d'un excès d'histones nouvellement synthétisées est néfaste pour les cellules car les histones libres se lient de manière non-spécifique aux acides nucléiques. L'un des mécanismes mis en place afin de minimiser la quantité d'histones libres consiste à réprimer la transcription des gènes d'histones lors d'une chute rapide de la synthèse d'ADN, mais les bases moléculaires de ce mécanisme étaient très mal connues. Notre étude sur la répression des gènes d'histones en réponse aux agents génotoxiques nous a permis d'identifier que les kinases du point de contrôle jouent un rôle dans la répression des gènes d'histones. Avant le début de mon projet, il était déjà connu que le complexe HIR est requis pour la répression des gènes d'histones en phase G1, G2/M et lors de dommage à l'ADN en phase S. Par contre, la régulation du complexe HIR en réponse au dommage à l'ADN n'était pas connue. Nous avons démontré par des essais de spectrométrie de

masse (SM) que Rad53 régule le complexe HIR en phosphorylant directement une de ses sous-unités, Hpc2, à de multiples résidus *in vivo* et *in vitro*. La phosphorylation d'Hpc2 est essentielle pour le recrutement aux promoteurs de gènes d'histones du complexe RSC (*Remodels the Structure of Chromatin*) dont la présence sur les promoteurs des gènes d'histones corrèle avec leur répression. De plus, nous avons mis à jour un nouveau mécanisme de régulation du complexe HIR durant la progression normale à travers le cycle cellulaire ainsi qu'en réponse aux agents génotoxiques. En effet, durant le cycle cellulaire normal, la protéine Hpc2 est très instable durant la transition G1/S afin de permettre la transcription des gènes d'histones et la production d'un pool d'histones néo-synthétisées juste avant l'initiation de la réplication de l'ADN. Toutefois, Hpc2 n'est instable que pour une brève période de temps durant la phase S. Ces résultats suggèrent qu'Hpc2 est une protéine clef pour la régulation de l'activité du complexe HIR et la répression des gènes d'histones lors du cycle cellulaire normal ainsi qu'en réponse au dommage à l'ADN.

Dans le but de poursuivre notre étude sur la régulation des histones, le chapitre III de ma thèse concerne l'analyse globale de l'acétylation des histones induite par les inhibiteurs d'histone désacétylases (HDACi) dans les cellules normales et cancéreuses. Les histones désacétylases (HDACs) sont les enzymes qui enlèvent l'acétylation sur les lysines des histones. Dans plusieurs types de cancers, les HDACs contribuent à l'oncogenèse par leur fusion aberrante avec des complexes protéiques oncogéniques. Les perturbations causées mènent souvent à un état silencieux anormal des suppresseurs de tumeurs. Les HDACs sont donc une cible de choix dans le traitement des cancers engendrés par ces protéines de fusion.

Notre étude de l'effet sur l'acétylation des histones de deux inhibiteurs d'HDACs de relevance clinique, le vorinostat (SAHA) et l'entinostat (MS-275), a permis de démontrer une augmentation élevée de l'acétylation globale des histones

H3 et H4, contrairement à H2A et H2B, et ce, autant chez les cellules normales que cancéreuses. Notre quantification en SM de l'acétylation des histones a révélé de façon inattendue que la stœchiométrie d'acétylation sur la lysine 56 de l'histone H3 (H3K56Ac) est de seulement 0,03% et, de manière surprenante, cette stœchiométrie n'augmente pas dans des cellules traitées avec différents HDACi. Plusieurs études de H3K56Ac chez l'humain présentes dans la littérature ont rapporté des résultats irréconciliables. Qui plus est, H3K56Ac était considéré comme un biomarqueur potentiel dans le diagnostic et pronostic de plusieurs types de cancers. C'est pourquoi nous avons porté notre attention sur la spécificité des anticorps utilisés et avons déterminé qu'une grande majorité d'anticorps utilisés dans la littérature reconnaissent d'autres sites d'acétylation de l'histone H3, notamment H3K9Ac dont la stœchiométrie d'acétylation *in vivo* est beaucoup plus élevée que celle d'H3K56Ac. De plus, le chapitre IV fait suite à notre étude sur l'acétylation des histones et consiste en un rapport spécial de recherche décrivant la fonction de H3K56Ac chez la levure et l'homme et comporte également une évaluation d'un anticorps supposément spécifique d'H3K56Ac en tant qu'outil diagnostique du cancer chez l'humain.

Mots-clés : chromatine, histones, complexe HIR, Rad53, dommage à l'ADN, acétylation de H3, agent génotoxique, histone désacétylase, HDAC, inhibiteur d'histone désacétylase, HDACi, SAHA, MS-275, H3K56Ac, H3K9Ac, réplication de l'ADN, complexe RSC, micropuce tissulaire, histologie, spectrométrie de masse.

Abstract

The chromatin is a complex structure and its plasticity is essential to complete different fundamental cellular processes such as DNA replication, transcription and repair. Furthermore, chromatin malfunction is often associated with cancer emergence. The focus of this thesis will be on the function and regulation of histones, as they are essential components of nucleosomes and they ensure proper chromatin formation.

Chapter II of this thesis focuses on the transcriptional repression of histone genes by the HIR (HIstone gene Repressor) complex in response to DNA damage in *Saccharomyces cerevisiae*. When DNA damage occurs in early S phase, the DNA damage checkpoint kinases Mec1, Tel1 and Rad53 block late origins of replication to limit potentially mutagenic or cytotoxic collisions between DNA polymerases and remaining DNA lesions. When the total DNA synthesis rate drops suddenly in S-phase, following the checkpoint control activation, accumulation of newly synthesized histones becomes detrimental for the cells because free histones bind non-specifically to nucleic acids. One mechanism that contributes to a reduction in free histones at this time is the repression of histone gene transcription; however, the molecular basis of this repression was not known. Our study on histone gene repression in response to genotoxic agents allowed us to identify the checkpoint kinases as major players in the repression of histone genes. Before initiating this project, it was known that the HIR complex is required to repress histone genes in G1 and G2/M phases and during DNA damage. Nonetheless, HIR complex regulation was not well characterized. We demonstrated by mass spectrometry (MS) analyses that Rad53 regulates the HIR complex by directly phosphorylating one of its subunits, Hpc2, at many residues *in vivo* and *in vitro*. Hpc2 phosphorylation is essential to recruit the RSC complex (Remodels the Structure of Chromatin) to histone gene promoters where its presence correlates with histone gene repression. Moreover, we uncovered a novel mechanism for the HIR complex regulation during a normal cell cycle progression and in response to genotoxic agents. Indeed, during a

normal cell cycle, the Hpc2 protein is very unstable at the G1/S transition to allow histone gene transcription and production of a pool of newly synthesized histones just before DNA replication initiation. These results suggest that Hpc2 is a key player in the regulation of HIR complex activity and can repress histone gene expression both during a normal cell cycle and in response to DNA damage.

In order to pursue our study on histone regulation, chapter III of this thesis covers histone acetylation induced by histone deacetylase inhibitors (HDACi) in normal and cancer cells. Histone deacetylases (HDACs) are enzymes that remove acetyl groups from lysine residues on histones, condensing the chromatin and effectively repressing local transcription. Several types of cancers are characterized by epigenetic abnormalities and HDACs contribute to oncogenesis by aberrant fusion with oncogenic protein complexes. The disruptions often lead to an abnormal silent state of tumour suppressors. HDACs are then targets of interest in cancer treatment caused by those fusion proteins.

Our study of the effects of two clinically relevant HDAC inhibitors, vorinostat (SAHA) and entinostat (MS-275) on acetylation of histones demonstrated an obvious increase of histones H3 and H4 acetylation, unlike histones H2A and H2B in both normal and cancer cells. Unexpectedly, our MS quantification of histone acetylation revealed that the stoichiometry of histone H3 lysine 56 acetylation (H3K56Ac) was only 0.03% and, surprisingly, this stoichiometry did not increase upon HDACi treatments. Several reported studies in the literature of H3K56Ac in humans are irreconcilable. Furthermore, H3K56Ac was considered as a potential biomarker in diagnosis and prognosis in many cancer types. Therefore we focussed on antibody specificity and determined that the majority of antibodies used in the literature recognize other acetylation sites in histone H3, especially H3K9Ac whose stoichiometry of acetylation *in vivo* is much higher than H3K56Ac. Additionally, chapter IV is a follow-up of our study on histone acetylation and consists of a special report describing the function of H3K56Ac in yeast and human and also contains an

evaluation of a supposedly specific H3K56Ac antibody as a diagnostic tool in human cancers.

Key words: chromatin, histones, HIR complex, Rad53, DNA damage, H3 acetylation, genotoxic agent, histone deacetylase, HDAC, histone deacetylase inhibitor, HDACi, SAHA, MS-275, H3K56Ac, H3K9Ac, DNA replication, RSC complex, tissue microarray, histology, mass spectrometry.

Table des matières

Résumé.....	i
Abstract.....	iv
Liste des tableaux.....	xi
Liste des figures.....	xii
Liste des abréviations.....	xiv
Remerciements.....	xvii
Contribution des co-auteurs.....	xix
I.1. Introduction sur la chromatine.....	2
I.1.1. Historique.....	2
I.1.2. Structure de la chromatine.....	3
I.1.2.1. Le nucléosome : l'unité fondamentale de la chromatine.....	5
I.1.2.2. La fibre de 30 nm.....	6
I.1.2.3. Euchromatine et hétérochromatine.....	7
I.2. La régulation des gènes d'histones chez la levure à bourgeonnement.....	8
I.2.1. Régulation transcriptionnelle des gènes d'histones.....	8
I.2.1.1. Activation des gènes d'histones.....	9
I.2.1.2. Gène suppresseur de l'élément Ty1 10 (Spt10).....	9
I.2.1.3. Gène suppresseur de l'élément Ty1 21 (Spt21).....	10
I.2.1.4. Les facteurs de transcription SBF et MBF.....	11
I.2.1.5. Le facteur Yta7.....	12
I.2.2. Répression des gènes d'histones.....	14
I.2.2.1. Le complexe HIR chez <i>S. cerevisiae</i>	14
I.2.2.2. Élément NEG.....	18
I.2.2.3. Les chaperones Asf1 et Rtt106 et la répression des gènes d'histones.....	19
I.2.2.4. Remodelage de la chromatine.....	20
I.2.2.5. Les complexes remodeleurs de chromatine SWI/SNF et RSC.....	20

I.2.2.6 Le complexe HIR et ses autres fonctions dans la régulation de la chromatine	23
I.2.2.6.1 Assemblage des nucléosomes	23
I.2.2.6.2. L'hétérochromatine et le <i>silencing</i> transcriptionnel.....	25
I.2.2.6.3. Parallèle entre le complexe HIR chez la levure et l'être humain.....	26
I.2.2.6.4. Élongation transcriptionnelle et répression des promoteurs cryptiques	32
I.2.3 Régulation post-transcriptionnelle des gènes d'histones	35
I.2.4 Régulation de la dégradation des histones	39
I.2.5 Effets néfastes de l'excès d'histones.....	42
I.3 Le point de contrôle intra-S	42
I.3.1. Cascade d'activation du point de contrôle intra-S	45
I.3.2 Les agents génotoxiques	48
I.3.2.1 Méthyl méthane sulfonate (MMS)	49
I.3.2.2 Hydroxyurée (HU).....	49
I.4 Modifications de la chromatine	50
I.4.1. Acétylation des histones	50
I.4.2 Histone acétyltransférase.....	51
I.4.3 Inhibiteurs de HATs	53
I.4.4 Histone désacétylase.....	54
I.4.5 Inhibiteurs de HDACs	55
I.4.6 Acétylation de l'histone H3 sur la lysine 56 (H3K56Ac)	56
I.4.7 Assemblage des nucléosomes lors de la réplication.....	58
I.5 Objectifs de la thèse.....	60
Chapitre II. Checkpoint Kinase Mediated Repression of Histone Genes Upon Genotoxic Stress	63
I.1 Abstract.....	64
II.2 Introduction	65
II.3 Experimental procedures	70
II.4 Results	74

Rad53 triggers histone gene promoter repression in response to DNA lesions that impede replication.....	78
II.5. Discussion.....	93
II.6 Supplemental material.....	100
II.7 Supplemental information	109
II.8 Acknowledgments	117
Chapitre III. Histone Deacetylase Inhibitors Globally Enhance H3/H4 Tail Acetylation Without Affecting H3 Lysine 56 Acetylation.....	119
III.1 Abstract	120
III.2 Introduction	121
III.3 Experimental procedures.....	124
Immunoblotting	124
Sample preparation and protein digestion	124
Intact histone profiling	126
Ion profiling and peptide sequencing by LC-MS/MS	126
Targeted analysis of H3K56ac by multiple reaction monitoring and absolute quantitation	128
I.4 Results.....	129
Cell viability and cell cycle progression in response to HDACi.....	129
Global histone acetylation probed by intact mass profiling.....	131
III.5 Discussion	150
III.6 Supplemental information.....	153
III.7 Supplemental information	159
III.8 Acknowledgments.....	160
Chapitre IV. Histone H3 Lysine 56 Acetylation as a Cancer Biomarker?	162
IV.1 Abstract	163
IV.2 Introduction.....	164
IV.3 Experimental procedures	171
IV.4 Results.....	172
IV.5 Discussion	176

Chapitre V Discussion générale.....	178
V.1 Implication du point de contrôle intra-S dans la répression des gènes d’histones	178
V.1.1 Nouveau rôle des kinases du point de contrôle	178
V.1.2 La régulation du complexe HIR se fait via Hpc2	181
V.1.3 Les gènes d’histones sont réprimés en milieu de phase S	182
V.1.4 La transcription des gènes d’histones à la transition G1/S corrèle avec l’instabilité de la protéine Hpc2	183
V.2 Perspectives : la régulation transcriptionnelle des histones	185
V.2.1 Le signal qui initie la régulation négative des histones	185
V.3 Le patron global des modifications post-traductionnelles des histones suite aux traitements par les inhibiteurs d’histones désacétylases	188
V.3.1 Abondance de l’acétylation des histones H3 et H4 par les HDACi	188
V.3.2 Spécificité des anticorps contre l’histone H3 lysine 56 acétylée.....	190
V.4 Perspectives : acétylation des histones.....	191
V.4.1 H3K9Ac ou H3K56Ac, telle est la question!	191
V.5 Conclusion.....	193
Chapitre VI Sources documentaires.....	196
When enough is enough: detrimental effects of excess histones.....	I
Annexe II. Faculty 1000 Prime, Article Recommendation	III
Comment on: Two-color cell array screen reveals interdependent roles for histone chaperones and a chromatin boundary regulator in histone gene repression.....	III

Liste des tableaux

Table I. 1 Noms alternatifs pour les effecteurs lors du dommage à l'ADN	44
Table II.S 1 Hpc2 phosphorylation sites.....	100
Table II.S 2 Hpc2 mutants tested for HU-induced histone gene repression <i>in vivo</i> .	101
Table II.S 3 Yeast strains used in this study	102
Table III. 1 Stoichiometry and amounts of H3K56ac detected in transformed cells exposed to different HDACi	142
Table III.S 1 to 10. Histone H3 volcano plot intensity data	158

Liste des figures

Figure I.1 La chromatine est une structure complexe qui possède plusieurs niveaux d'organisation	4
Figure I.2 Octamère d'histones formé des histones de cœur histones H2A, H2B, H3 et H4.....	5
Figure I.3 Micrographes électroniques de la chromatine	6
Figure I.4 Principaux facteurs qui se lient aux promoteurs des gènes d'histones chez <i>S. cerevisiae</i>	13
Figure I.5 Les domaines fonctionnels du complexe HIR	15
Figure I.6 Régulation du niveau d'histones par Rad53	41
Figure I.7 Réponse aux cassures double brin chez <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	47
Figure I.8 Régulation et fonctions de l'acétylation de l'histone H3 lysine 56	58
Figure II.1 Rad53 is not required for cell cycle regulation of histone gene transcription	67
Figure II.2 Downregulation of histone mRNAs in response to hydroxyurea (HU) and Methyl Methane Sulfonate (MMS) is impaired in rad53 mutant cells	76
Figure II.3 Histone gene repression in response to hydroxyurea is dependent upon continuous activity of the protein kinases Mec1 and Tel1	80
Figure II.4 Hpc2 phosphorylation <i>in vivo</i> and <i>in vitro</i>	82
Figure II.5 Two clusters of Hpc2 residues contribute to downregulation of histone transcripts upon replication inhibition	83
Figure II.6 Hpc2 is degraded during the G1-S transition and stabilized in mid S-phase.	86
Figure II.7 HU-induced repression of the <i>HTA1-HTB1</i> promoter is triggered by Rad53 and phosphorylated Hpc2 dependent recruitment of the RSC chromatin remodeling complex to the promoter.....	89
Figure II.8 Physical interactions between Rad53, Hir proteins and the RSC complex.	92
Figure III.1 Cell cycle distribution and viability of K562 cells are not affected by treatment with MS-275 or SAHA.....	131
Figure III.2 LC-MS analyses of intact histones derived from transformed cells	133
Figure III.3 Histone H3 and H4 peptide ion intensity profiling using volcano plots	135
Figure III.4 Identification and quantitation of H3K56ac from K562 cells using targeted MRM.....	136

Figure III.5 LC-MS/MS analysis of H3K56ac from K562 cells using an LTQ-Orbitrap XL mass spectrometer.....	143
Figure III.6 Antibodies supposedly specific for H3K56ac cross-react against other acetylated lysine residues of histone H3.....	148
Figure III.S1. Doubling time for different cell types.....	154
Figure III.S2. Cell viability assay for K562 cells exposed to different concentrations of SAHA and MS-275 for periods up to 48h.....	154
Figure III.S3. Cell viability assay for IMR90 normal diploid fibroblasts exposed to different concentrations of SAHA for 48h	155
Figure III.S4. Cell viability assays performed with WI38 normal diploid fibroblasts cells exposed to 1µM SAHA or 1µM MS-275 for different periods of time.....	155
Figure III.S5. LC-MS analyses of intact histones derived from IMR90 normal diploid fibroblast cells.....	156
Figure III.S6. Total ion chromatogram (TIC) for histones derived from control K562 cells that were not treated with SAHA	156
Figure III.S7. LC-UV chromatogram corresponding to the fractionation by reverse-phase HPLC of intact core histones that were acid-extracted from control K562 cells	157
Figure III.S8. Synthetic peptides used as competitors in the immunoblotting assays	157
Figure IV.1. Immunohistochemistry performed with Eptomics EPR996Y antibody in 4 µm thick tissue microarray sections from normal tonsils, breast and colon cancer samples.....	175
Figure V.1. Le signal de détection de l'excès d'histones passerait par le complexe HIR (A) Schéma montrant que le complexe HIR aux promoteurs des gènes d'histones doit se lier avec les histones H3-H4 pour réprimer les gènes d'histones. (B) L'absence de liaison entre le complexe HIR et les histones H3-H4 empêche la répression transcriptionnelle des gènes d'histones.....	187

Liste des abréviations

3'oligo(U)	3'oligonucléotide uridylation
5'-cap	Coiffe à l'extrémité 5'
Ac	Acétylation
ADN	Acide désoxyribonucléique
ARN	Acide ribonucléique
ARNt	ARN de transfert
ARNPII	ARN Polymérase II
CBN1	CABIN1
CID	<i>Collision induced dissociation</i>
ChIP	Immunoprécipitation de la chromatine
ChIP-seq	ChIP-séquençage
CTIF	<i>Cap-binding complex-dependent translation initiation factor</i>
CTL	<i>Control</i>
Da	Dalton
dNTP	Déoxyribonucléotide triphosphate
EMSA	Retard sur gel (<i>Electrophoretic Mobility Shift Assay</i>)
EPT	Effet de position télomérique
ETD	<i>Electron transfer dissociation</i>
ES	<i>Embryonic stem</i>
FACS	<i>Flow cytometry</i>
GFP	Protéine fluorescente verte
HAT	<i>Histone acetyltransferase</i>
HDAC	Histone déacétylase
HDACi	Inhibiteur d'histone déacétylase
HIR	<i>Histone Repressor</i>
Hir	<i>Histone repressor protein</i>
HP1	<i>Heterochromatin Protein 1</i>
Hpc2	<i>Histone Promoter Control 2</i>
HPLC	<i>High performance liquid chromatography</i>
HRD	<i>Hpc2-related domain</i>
HU	Hydroxyurée
HUN	<i>Hpc2/Ubinuclein 1</i>
HRD	<i>Hpc2 Related Domain</i>
IF	Immunofluorescence
IHC	<i>Immunohistochemistry</i>
IP	Immunoprécipitation
LC-MS	<i>Liquid chromatography interfaced with electrospray</i>
MEF	<i>Mouse embryonic fibroblast</i>

Me	Méthylation
Me1	Mono-méthylation
Me2	Di-méthylation
Mec1	<i>Mitosis Entry Checkpoint 1</i>
μL	<i>Volume in microliters</i>
MMS	Méthyl méthane sulfonate
Ms	<i>Milisecond</i>
m/z	<i>mass-to-charge ratio</i>
NCP	<i>Nucleosome Core Particle</i>
NEG	Négatif en cis (<i>negative cis-acting element</i>)
ng	<i>Nanogram</i>
PCFM	Point de contrôle du fuseau mitotique
PCR	Réaction en chaîne par polymérase
Phe	<i>Phenylalanine</i>
Pi	Phosphate inorganique
Pr	Propionylation
PT	Post-traductionnel
PTM	<i>Post-translational modification</i>
q-TOF	<i>Quadrupole-time of flight mass spectrometer</i>
Rad53	<i>RADiation sensitive 53</i>
Rnr	Ribonucléotide réductase
RT-qPCR	Transcription inverse suivi du PCR quantitatif
RSC	<i>Remodels the Structure of Chromatin</i>
SAβ-gal	<i>Senescence-Associated β-galactosidase</i>
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>S. pombe</i>	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>
SAHF	<i>Senescence-associated heterochromatin foci</i>
shRNA	<i>short hairpin RNA</i>
SLBP	<i>Stem-loop binding protein</i>
SM	Spectrométrie de masse
SWI/SNF	<i>SWItch defective/Sucrose NonFermentive</i>
Tel1	<i>TELOmere maintenance 1</i>
Th	Thompson
TIC	<i>Total ion chromatogram</i>
TPR	Tétratricopeptide
TPE	<i>Telomeric position effect</i>
TSS	Site d'initiation de la transcription
TSA	Trichostatine A
TUTase	<i>Terminal uridylyl transferase</i>
Tyr	Tyrosine
UAS	<i>Upstream activation site</i> (site d'activation en amont)
WT	Type sauvage

À mon mari Vincent Morin, que j'adore !

Remerciements

Tout d'abord, je voudrais remercier l'ensemble des membres de mon jury pour avoir accepté d'évaluer cette thèse soit Dr. François Robert, Dr. Pascal Chartrand et Dr. Josée Dostie pour m'avoir donné leurs conseils, remarques et support durant toute la durée de mes études doctorales par les comités de suivi annuels. Je tiens particulièrement à remercier chaleureusement mon directeur de recherche, Dr. Alain Verreault, pour m'avoir accueilli dans son laboratoire, pour son soutien, ses idées, ses encouragements, nos discussions enrichissantes sur la science et surtout pour m'avoir transmis sa passion pour la recherche. Merci également à Pascale Le Therizien et Vivianne Jodoin du programme de biologie moléculaire, spécialement à Vivianne qui a été très présente pour moi durant mon cheminement académique.

J'aimerais remercier tous les membres du laboratoire, passés et présents, pour leur écoute, leur apport scientifique, leur présence, leur amitié et leurs conseils fort utiles. Merci à ma stagiaire Audrey Pelletier qui a travaillé avec moi sur le projet Hpc2. J'ai passé des années agréables en leur compagnie et nos fameuses sorties au Pub le vendredi vont me manquer! Je voudrais exprimer mes remerciements aux co-auteurs avec qui j'ai collaboré soit Paul et Ugander ainsi que les Drs. Pierre Thibault (IRIC), Gerardo Ferbeyre (UdeM), Johanna Paik et Akash Gunjan (Université de Tallahassee, Floride). Ce fut un plaisir de travailler avec eux. Merci à mes camarades du cours de maîtrise BIM6064 de la cohorte 2008 qui m'ont aidé à m'adapter à la grande ville de Montréal et avec qui j'ai développé une grande amitié soit Valérie De Rop, Thai-Hang Nguyen, Fatiha Louhichi et Donovan Nguon. Un MERCI particulier à Valérie et Fatiha d'avoir toujours été là pour moi et d'avoir cru en moi, vous êtes des amies exceptionnelles et votre amitié est précieuse! Puis, je voudrais remercier ma bonne amie Allison M. L. Nixon que j'ai eu la chance de rencontrer lors d'un stage effectué

dans notre laboratoire en 2009; je me compte bien chanceuse de l'avoir connue pendant mon doctorat.

Je ne voudrais surtout pas oublier d'exprimer ma gratitude envers ma famille qui m'a toujours encouragé durant mes études, merci à mes parents et grands-parents et mille fois mercis à ma petite sœur Audrey, avec qui j'ai cohabité pendant plus de cinq ans durant nos études et qui a été ma plus grande « supporter » depuis le début de mes études universitaires! Puis je voudrais sincèrement remercier mon mari Vincent pour m'avoir épaulé et encouragé pendant toutes ces années pas toujours faciles au doctorat. Merci à vous deux qui détenez une grande part de mérite dans l'accomplissement et la réussite de mes projets. Puis, je voudrais glisser un mot de remerciement symbolique à mon chat Little Jack qui a su m'accompagner pendant mes longues heures de rédaction assis près de moi sur sa couverture ou couché sur mes articles scientifiques. Malheureusement, Little Jack est décédé en septembre dernier, il était sur sa couverture préférée à me regarder pendant que j'écrivais ma thèse... Repose en paix! Merci à ma fille Olivia-Rose dont la pensée de pouvoir lui raconter mes souvenirs de doctorat et de lui parler de ce grand accomplissement le jour où elle sera plus grande, me comble de fierté en écrivant cette thèse.

Finalement, je tiens à remercier avec reconnaissance les différents organismes subventionnaires qui ont permis la réalisation de mes recherches : Fonds de recherche du Québec - Santé (FRQS), Instituts de recherche en santé du Canada (IRSC), Programmes de biologie moléculaire de l'Université de Montréal et Faculté des études supérieures et postdoctorales de l'Université de Montréal.

Contribution des co-auteurs

Chapitre II. Checkpoint Kinase Mediated Repression of Histone Genes Upon Genotoxic Stress

V.V. and R.G. carried out experiments, analysed the data, prepared figures and discussed data with the other authors. V.V. constructed all mutant strains (mutagenesis) and revised and reviewed the paper after first submission by adding new data and wrote the latest version of the manuscript. M-H.K. and M.G. carried out yeast cell culture and MS experiments. P.T. discussed MS results. A.V., A.G. and J.P. designed the study, analysed data, discussed results and wrote the manuscript. A.V., A.G. and J.P. oversaw the manuscript and J.P. is the corresponding author.

Chapitre III. Histone Deacetylase Inhibitors Globally Enhance H3/H4 Tail Acetylation Without Affecting H3 Lysine 56 Acetylation

P.D. and V.V. carried out experiments, analysed the data, prepared figures and wrote the first draft of the manuscript. C.P., E.-H. L., and V. B. carried out cell culture and cell viability experiments, analysed the data, and prepared figures. E.B. participated in the MS analyses. G.F. provided cell cultures and discussed results. A.V. and P.T. designed the study, analysed data, discussed results and wrote the manuscript. All authors reviewed the manuscript.

Chapitre IV. Histone H3 Lysine 56 Acetylation: Using the Histone Modification as a Cancer Biomarker?

V.V. carried out the literature review on the acetylation of histone H3 lysine 56, analysed the data from the histology platform, prepared the figure, wrote the first draft of the manuscript and discussed data with the other authors. J.H. carried out immunohistochemistry staining and A.V. and L.G. designed the study and analysed the data. V.V. wrote the manuscript with A.V.

Chapitre I
Introduction

I.1. Introduction sur la chromatine

I.1.1. Historique

Vers la fin du XIXe siècle le biologiste allemand Walther Flemming a observé pour la première fois le mouvement des chromosomes lors de la division de cellules embryonnaires de salamandre. À l'aide d'une coloration à l'aniline de ces cellules, il étudia le phénomène sous microscope et le nomma «mitose». Il inventa également le terme «chromatine» pour nommer les structures denses et colorées en mouvement qu'il observa (Flemming 1882, Hughes 1959, Paweletz 2001). Par la suite, les imminents chercheurs Friedrich Miescher et Albrecht Kossel, en isolant des noyaux de leucocytes, firent la découverte de la nucléine, ce que nous connaissons aujourd'hui comme étant les acides nucléiques et également de la protamine, une molécule basique s'associant à la nucléine. Quant à Kossel, il décrivit les histones pour la première fois en 1884 par l'étude d'érythrocytes d'espèces aviaires qui, contrairement aux érythrocytes humains, conservent leur noyau cellulaire. De nombreuses études de la chromatine ont été effectuées à travers les décennies qui suivirent, mais ce n'est qu'en 1944 que les chercheurs Oswald Avery, Colin MacLeod et Maclyn McCarty décrivent l'acide désoxyribonucléique (ADN) chez la bactérie et conclurent que l'information contenue dans l'ADN est à l'origine de l'hérédité (Avery *et al.* 1944). Ainsi, les premières informations structurales sur l'ADN émergent. Puis, en 1950, Erwin Chargaff découvrit les nucléotides et décrivit qu'à l'intérieur de l'ADN les bases azotées adénine et thymine étaient en quantités égales et que cela valait aussi pour la cytosine et la guanine (Chargaff 1950). Peu de temps après, Watson et Crick firent la découverte de la structure de l'ADN en double hélice en se basant entre autres sur des photographies de diffraction aux rayons X obtenus par Rosalind Franklin (Watson and Crick 1953, Klug 1974, Olby 1974). Le fractionnement des histones par des méthodes biochimiques avant-gardistes pour l'époque et la visualisation des sous-unités de la chromatine au microscope électronique ont permis d'analyser plus en détail les histones et le niveau de compaction de l'ADN (Dick and Johns 1969, Olins and Olins 1972, Burgoyne *et*

al. 1974). Le terme nucléosome fait par la suite son apparition dans la communauté scientifique grâce aux réputés chercheurs Roger Kornberg, Jean Thomas, Pierre Oudet, Maria Gross-Bellard et Pierre Chambon qui réussirent avec succès à isoler un nucléosome et conclurent que ce dernier est composé d'environ 200 paires de bases d'ADN et de quatre histones F2 α 1 (H4), F2 α 2 (H2A), F2b (H2B) et F3 (H3) dont le ratio de masse histone/ADN est de 0,97 (Kornberg 1974, Oudet *et al.* 1975). Cette découverte de l'ADN qui est enroulé autour d'un cœur globulaire composé par les histones suggérait une structure du nucléosome favorable à l'interaction avec d'autres protéines nucléaires. Cette précision sur le nucléosome révolutionna la conception de la chromatine chez les scientifiques et la quête de la résolution de la structure cristalline du nucléosome fut d'une importance cruciale afin de mieux comprendre sa fonction et sa régulation. C'est donc dans les années 1980 que les Drs. Richmond et Luger obtinrent la structure cristalline par rayons X d'une particule de cœur du nucléosome (NCP), premièrement à une résolution de 7 Å et puis, quelques années plus tard, à une précision de 2,8 Å (Richmond *et al.* 1984, Luger *et al.* 1997). Les travaux de Luger et Richmond sur la cristallisation du nucléosome composé de l'ADN satellite α et d'histones recombinantes permirent de confirmer que, grâce aux interactions électrostatiques entre ceux-ci, précisément 147 paires de bases d'ADN s'enroulent autour du cœur d'histones de façon à former une super-hélice. Finalement, nous discuterons en détail dans la prochaine section qu'il a été proposé que l'information épigénétique se retrouverait dans des modifications covalentes réversibles des queues N-terminales des histones et qu'un code des histones existe afin de répertorier ces modifications et de les associer à différents phénomènes épigénétiques (Turner 1993, Jenuwein and Allis 2001).

I.1.2. Structure de la chromatine

Les molécules d'ADN dépasseraient largement de milliers de fois le diamètre du noyau cellulaire si elles n'étaient pas enroulées autour d'un cœur d'histones. Chez la

cellule eucaryote, le chromosome constitue l'un des niveaux de compaction les plus denses et ces longues molécules sont repliées sur elles-mêmes de façon ordonnée afin de pouvoir occuper l'espace nucléaire restreint (Figure I.1). Il existe plusieurs niveaux de compaction de l'ADN. Le premier niveau de compaction étant constitué du repliement de l'ADN avec les histones pour former le nucléosome qui réduit de sept fois la taille de l'ADN comparativement à l'ADN nu non enroulé. En deuxième lieu, la fibre de 30 nm correspond à un filament encore plus dense qui est de quarante fois plus petit que la taille seule de l'ADN nu (Woodcock *et al.* 1976). En dernier lieu, l'ADN compacté forme des domaines chromatiniens fonctionnels tels que l'hétérochromatine et l'euchromatine qui sont régulés de façon rigoureuse afin de permettre à la cellule de pouvoir procéder à différents processus cellulaires, dont la transcription, la réplication et la réparation de l'ADN. Pour ce faire, diverses enzymes et protéines nucléaires agissent en modifiant les NCPs afin de permettre à la chromatine d'une région précise de se déplier et de se replier selon la nécessité. Ainsi, la chromatine possède une plasticité qui lui est propre.

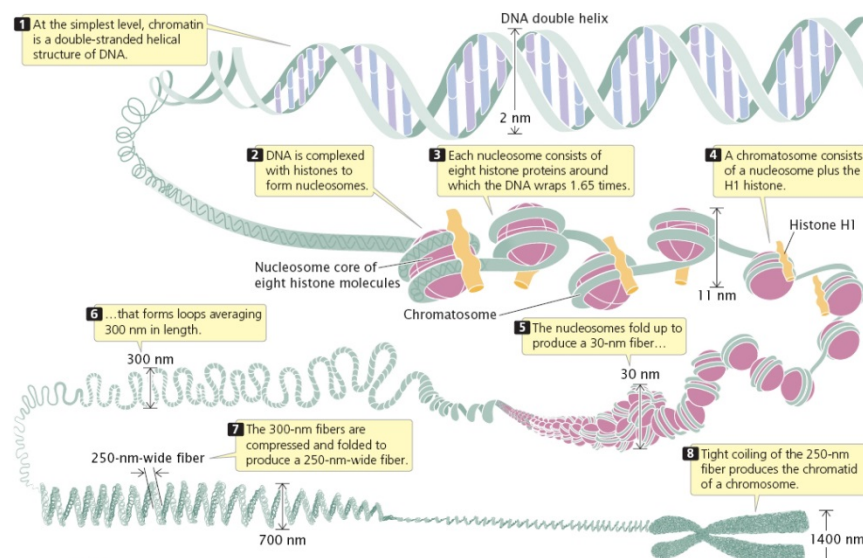


Figure I.1 La chromatine est une structure complexe qui possède plusieurs niveaux d'organisation. La double hélice d'ADN est le premier niveau structural de l'ADN (Pierce 2005). Figure tirée de: *Genetics: A Conceptual Approach*, 5^e édition par Benjamin Pierce, Copyright 2014 par W.H. *Freeman and Company*. Utilisée avec la permission de l'éditeur.

I.1.2.1. Le nucléosome : l'unité fondamentale de la chromatine

Le nucléosome est l'unité répétitive de la chromatine et il est composé de 147 pb d'ADN enroulé en 1,65 tour autour d'un octamère d'histones. Les histones, extrêmement conservées au cours de l'évolution, sont des petites protéines basiques de 10 à 15 kDa. Leurs séquences en acides aminés contiennent plus de 20% de résidus lysine et arginine d'où leur forte interaction électrostatique avec l'ADN. L'octamère d'histones quant à lui est composé d'un tétramère d'histones H3-H4 associé à deux dimères d'histones H2A-H2B (Figure I.2) (White *et al.* 2001, Luger 2003). Les paires d'histones qui s'associent entre elles pour former l'octamère qui lie l'ADN le font par le domaine globulaire, NCP, qui est composé de trois hélices alpha connectées par deux boucles. Cette structure permet donc la stabilisation du nucléosome (Chakravarthy *et al.* 2005). Les histones possèdent à leurs extrémités des queues N-terminale et C-terminale flexibles non structurées qui sont dirigées vers l'extérieur du NCP (Khorasanizadeh 2004).

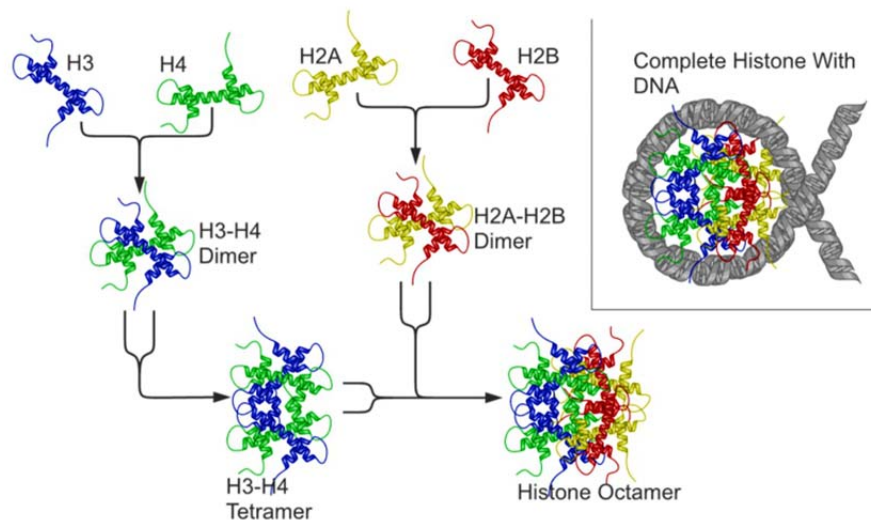
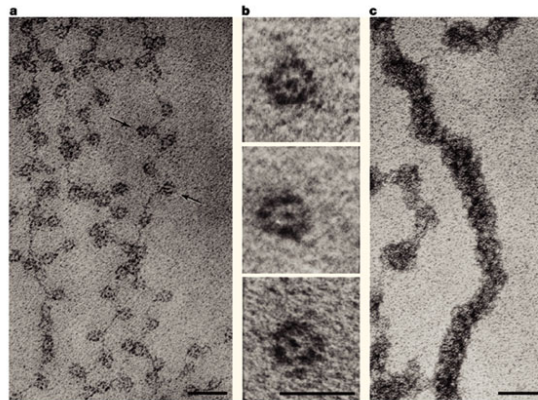


Figure I.2 Octamère d'histones formé des histones de cœur histones H2A, H2B, H3 et H4. Créée par Richard Wheeler (<http://en.wikipedia.org/wiki/Nucleosome>). Figure utilisée selon les termes de la *GNU Free Documentation License*.

I.1.2.2. La fibre de 30 nm

La fibre de 30 nm (Figure I.3 C) constitue le deuxième niveau de compaction de la chromatine et est stabilisée par l'histone H1 dont les domaines N-terminaux et C-terminaux se lient aux segments d'ADN inter-nucléosomal reliant les NCPs adjacents (Adkins *et al.* 2004). En absence d'histone H1, la fibre de chromatine observée au microscope électronique ressemble à un collier de perles dans lequel les NCPs occupent un diamètre de 10 nm (Figure I.3 A) (Olins and Olins 1972). Il est possible d'observer des mononucléosomes au microscope électronique lorsque la chromatine est digérée par une enzyme telle que la nucléase micrococcale qui digère l'ADN inter-nucléosomal (Figure I.3.B). Une particule consistant en un NCP contenant 165 pb d'ADN et l'histone H1 est appelée le chromatosome (Simpson 1978). Il est à noter que le domaine globulaire central de l'histone H1 est plus long et diffère de celui des histones formant le NCP. Le cœur globulaire est aussi flanqué de deux domaines hautement basiques aux deux extrémités, un domaine N-terminal court et un domaine C-terminal long et chargé positivement (Widom 1998). L'histone H1 et les ions de charge positive stabilisent la fibre de 30 nm en partie via sa capacité de neutraliser la charge électrostatique négative de l'ADN (Shen *et al.* 1995).



Nature Reviews | Molecular Cell Biology

Figure I.3 Micrographes électroniques de la chromatine. A) Étalemt de la chromatine à faible force ionique, le «beads on a string». Taille: 30 nm. B) Isolats de mononucléosomes dérivés de la digestion par une nucléase de la chromatine. Taille:

10 nm. C) Étalement de la chromatine à force ionique modérée pour maintenir la fibre de 30 nm. Taille: 50 nm [Revue: (Olins and Olins 2003)]. Figure tirée de: *Chromatin history: our view from the bridge*, Copyright 2003 par *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. Utilisée avec la permission de l'éditeur.

I.1.2.3. Euchromatine et hétérochromatine

L'euchromatine et l'hétérochromatine sont deux compartiments fonctionnels et structuraux qui caractérisent le niveau d'architecture et de compacité de la chromatine (Griffiths A.F. *et al.* 2000). L'euchromatine est moins condensée que l'hétérochromatine et contient la grande majorité des gènes activement transcrits et quiescents. L'hétérochromatine, quant à elle, est très condensée et apparaît fortement colorée après coloration de l'ADN. Cette partie du génome a été longtemps décrite comme étant non fonctionnelle et sans valeur (*junk*). L'hétérochromatine péricentrique est composée de séquences d'ADN répétitives non codantes incluant des éléments d'ADN satellites et transposables (Brown 1966, Sager and Kitchin 1975). Le terme chromatine silencieuse est également utilisé pour représenter des régions hétérochromatiques étant transcriptionnellement inactives, comme par exemple la région HM du locus MAT chez *Saccharomyces cerevisiae*, en fonction du type sexuel de la levure lorsqu'elle est haploïde (Mahoney and Broach 1989). La chromatine, quel que soit son état, qu'elle soit transcrite ou non, est régulée en partie par les modifications post-traductionnelles (MPT) des histones.

I.2. La régulation des gènes d'histones chez la levure à bourgeonnement

I.2.1. Régulation transcriptionnelle des gènes d'histones

Dans les cellules en prolifération, les gènes d'histones sont transcrits en phase S du cycle cellulaire durant la réplication de l'ADN. Les gènes d'histones sont présents à quatre loci et ont des promoteurs centraux divergents, c'est-à-dire que les gènes d'histones sont transcrits à partir de promoteurs dirigés dans deux directions opposées sur l'un et l'autre brin d'ADN matrice. Les deux loci *HHT1-HHF1* et *HHT2-HHF2* encodent des protéines H3 et H4 identiques (Smith and Murray 1983). En raison de leur redondance, une seule des deux paires de gènes *HHT-HHF* est nécessaire à la survie cellulaire (Smith and Stirling 1988). Les loci *HTA1-HTB1* et *HTA2-HTB2* encodent les protéines H2A et H2B (Hereford *et al.* 1979). Au point de vue phénotypique, lorsque les gènes *HTA1-HTB1* sont délétés dans une souche du fond génétique S288C, on observe une duplication épisomale des gènes *HTA2-HTB2* pour permettre la production d'une quantité d'histones H2A-H2B suffisante à la survie cellulaire. Une souche *htal-htb1Δ* dans un fond génétique W303 est inviable puisque cette souche ne possède pas les deux éléments transposables Ty1 qui flanquent *HTA2-HTB2* qui sont requis à sa duplication dans les cellules où *htal-htb1Δ* sont délétés (Libuda and Winston 2006).

Il faut souligner que les quantités d'histones sont étroitement régulées au niveau transcriptionnel, post-transcriptionnel ou post-traductionnel. *Saccharomyces cerevisiae* est un organisme modèle de choix pour l'étude de la régulation des histones, puisque la levure ne possède que deux copies de chaque gène encodant chaque histone du cœur nucléosomal, contrairement aux autres organismes eucaryotes tels les mammifères. Cette section abordera précisément les différents types de mécanismes qui régulent l'abondance des histones H2A, H2B, H3 et H4 et servira aussi à introduire les différents facteurs qui contribuent à cette régulation.

I.2.1.1. Activation des gènes d'histones

Les promoteurs des gènes d'histones possèdent des éléments particuliers appelés sites d'activation en amont (UAS) qui sont des séquences spécifiques de reconnaissance où se lient des facteurs de transcription tels Spt10 et le complexe SBF (composé des sous-unités polypeptidiques Swi4 et Swi6) afin de promouvoir la transcription des gènes d'histones durant la période de transition de la phase G1 à la phase S. Quatre éléments UAS se retrouvent aux promoteurs de chaque paire de gènes d'histones (Osley 1991, Eriksson *et al.* 2005). Grâce à des essais de délétion de ces éléments au promoteur des gènes d'histones H2A et H2B ou en insérant les éléments UAS dans un promoteur hétérologue, il a été montré que les éléments UAS dictent à eux seuls le temps précis où aura lieu la transcription des gènes d'histones et que cette transcription est rigoureusement régulée durant le cycle cellulaire (Osley *et al.* 1986).

I.2.1.2. Gène suppresseur de l'élément Ty1 10 (Spt10)

Le gène *SPT10* a été découvert dans un crible dont l'objectif était d'identifier des gènes dont la perte de fonction restaure la transcription d'un gène rapporteur dont le promoteur était altéré par l'insertion d'un transposon Ty1 (Fassler and Winston 1988). Spt10 n'est pas une protéine essentielle, mais la délétion du gène *SPT10* entraîne un défaut de croissance sévère chez la levure et affecte l'expression d'un grand nombre de gènes (Denis and Malvar 1990, Natsoulis *et al.* 1991, Dollard *et al.* 1994). Spt10 possède un domaine acétyltransférase. Malgré le fait que plusieurs essais expérimentaux ont été effectués afin de démontrer une activité HAT à ce jour, cela n'a jamais pu être établi. La protéine est un activateur direct des gènes d'histones et sa présence unique aux promoteurs de ces gènes a pu être démontrée par immunoprécipitation de la chromatine (ChIP) (Sherwood and Osley 1991, Dollard *et al.* 1994, Hess *et al.* 2004, Eriksson *et al.* 2005). De plus, Spt10 est un homodimère qui possède un domaine de liaison à l'ADN qui se lie spécifiquement à deux éléments UAS sur le promoteur des gènes d'histones. Les séquences UAS spécifiquement reconnues par Spt10 sont différentes de celles reconnues par d'autres facteurs de

transcription et ne sont présentes que dans les promoteurs de gènes d'histones (Hess *et al.* 2004, Eriksson *et al.* 2005). De plus, les niveaux d'ARN messagers (ARNm) encodant les histones sont grandement diminués dans une souche de levure *spt10Δ* (Xu *et al.* 2005, Mendiratta *et al.* 2007). Les changements d'abondance d'une multitude d'ARN messagers en absence de Spt10 ont été attribués à une carence en histones car les phénotypes du mutant *spt10Δ* sont supprimés par la surexpression d'H2A, H2B, H3 et H4 (Eriksson *et al.* 2005). Ces résultats suggèrent que Spt10 est un important activateur de la transcription des gènes d'histones et que son rôle principal est d'activer la transcription des gènes d'histones.

I.2.1.3. Gène suppresseur de l'élément Ty1 21 (Spt21)

Spt21 est une protéine régulée dans le cycle cellulaire dont l'expression est optimale au début de la phase S (Cho *et al.* 1998, Spellman *et al.* 1998). Spt21 est présente aux promoteurs des gènes d'histones H2A, H2B, H3 et H4 et est impliquée dans l'activation des gènes d'histones (Hess *et al.* 2004). En effet, l'expression d'ARNm d'histones est affectée à différentes amplitudes dans une souche *spt21Δ*, bien que cette souche ne possède pas de phénotype important de croissance comme la souche *spt10Δ* (Natsoulis *et al.* 1994). Les ARNm *HTA2-HTB2* sont grandement affectés dans une souche *spt21Δ*, tandis que les ARNm *HTA1-HTA2*, *HHT1-HHF1* et *HHT2-HHF2* sont affectés à un moindre niveau (Dollard *et al.* 1994, Hess and Winston 2005). De plus, Spt21 faciliterait la liaison de Spt10 aux promoteurs des gènes d'histones en phase S (Hess *et al.* 2004). Ces résultats suggèrent que Spt21 est impliquée dans la transcription des gènes d'histones. Néanmoins, Spt21 a été identifiée comme un répresseur d'un gène rapporteur *HTA1* dans un crible identifiant des régulateurs des gènes d'histones (Fillingham *et al.* 2009). Il semblerait que la fonction de Spt21 en tant que régulateur des gènes d'histones demeure à être examiné de plus près.

I.2.1.4. Les facteurs de transcription SBF et MBF

Le complexe SBF est composé des protéines Swi4 et Swi6 formant un hétérodimère tandis que le complexe MBF est formé des protéines Mbp1 et Swi6 et ces deux complexes sont les principaux régulateurs de la transcription en G1/S (Koch and Nasmyth 1994). Des études d'envergure à l'échelle génomique par l'utilisation de ChIPs ont permis de localiser les complexes SBF et MBF aux promoteurs des gènes d'histones, Mbp1 et Swi4 étant les facteurs liant directement l'ADN. Simon *et al.* ont observé SBF et MBF se liant directement aux promoteurs des gènes *HTA1-HTB1*, *HTA2-HTB2* et *HHO1* (le gène encodant une protéine similaire à l'histone H1) alors que Iyer *et al.* ont plutôt identifié MBF sur les promoteurs d'*HTA2-HTB2* et *HHT2-HHF2* puis SBF sur le promoteur d'*HHT2-HHF2* (Iyer *et al.* 2001, Simon *et al.* 2001). Malgré la divergence de ces deux études, SBF et MBF se lient effectivement aux promoteurs des gènes d'histones. La régulation de MBF est moins connue que celle de SBF. En effet, il existe deux sites de haute affinité de liaison de SBF aux éléments UAS3 et UAS4 qui chevauchent le site de liaison de Spt10 (figure I.4). Dans les cellules synchronisées en G1 à l'aide du facteur alpha, puis relâchées vers la phase S, Swi4 et les éléments UAS sont requis pour l'expression des ARNm dérivés du promoteur *HTA1-HTB1*, correspondant à un faible pic d'expression en phase S observé lors d'un essai utilisant un gène rapporteur fusionné au promoteur *HTA1-HTB1* (Eriksson *et al.* 2011). L'expression de SBF décline à la fin de la phase S, tout comme l'abondance du facteur de transcription Spt10. SBF/MBF permettent l'expression des gènes d'histones en absence de Spt10, ce qui est concordant avec le fait que le mutant *spt10Δ* est viable, mais Spt10 joue un rôle plus important, car un pic d'expression plus marqué est visible et est dépendant de la présence de Spt10 (Eriksson *et al.* 2011). Finalement, un double mutant *swi4Δspt10Δ* est synthétique létal ce qui signifie que SBF et Spt10 agissent ensemble pour contrôler l'expression temporelle de *HTA1-HTB1* (Hess and Winston 2005).

I.2.1.5. Le facteur Yta7

La protéine *Yeast Tat-binding Analog 7* (Yta7) fut principalement décrite comme ayant une fonction de protéine régulatrice modulant l'hétérochromatine pour ainsi maintenir l'état silencieux (*silencing*), état dit inactif du gène *HMRa* impliqué dans l'identité et la reproduction sexuelles des levures. *HMRa* est un des deux loci transcriptionnellement silencieux et hétérochromatique du type sexuel de la levure. La délétion du gène Yta7 rend les gènes avoisinants ce locus anormalement silencieux d'où la fonction importante de Yta7 agissant comme une barrière afin de limiter la propagation de l'hétérochromatine et du *silencing* au-delà du locus *HMRa* (Tackett *et al.* 2005). Yta7 possède un domaine AAA-ATPase et un bromodomaine. Ce dernier se lie aux histones du nucléosome d'une manière acétyllysine-indépendante (Gradolatto *et al.* 2008). Récemment, Yta7 a été identifiée comme ayant un tout nouveau rôle dans la transcription des gènes d'histones. En effet, par leur crible de génomique fonctionnelle utilisant un gène rapporteur consistant du promoteur d'*HTAI* fusionné à la région codante du gène de la protéine fluorescente verte (GFP) ainsi qu'une protéine contrôle exprimée constitutivement exprimant la protéine fluorescente rouge (RFP), Fillingham *et al.* ont étudié le niveau d'expression de *HTAI-GFP* dans la collection de délétions des gènes non-essentiels de levures (Giaever *et al.* 2002). Ils ont démontré que Yta7 est un régulateur des gènes d'histones puisque la fluorescence verte représentant le niveau d'expression du gène *HTAI-GFP* diminue dans une souche *yta7Δ* par rapport à la souche de type sauvage (WT) (Fillingham *et al.* 2009). De plus, dans une souche dont le domaine AAA-ATPase de Yta7 est muté, on remarque une augmentation de l'abondance de Rtt106 (une chaperone associée aux histones H3/H4) au locus *HTAI-HTBI* et une diminution marquée de la localisation de l'ARN polymérase II (ARNPII) à ce locus (Kurat *et al.* 2011). En fait, des analyses du profil des nucléosomes aux promoteurs des gènes d'histones suggèrent que Yta7 contribuerait à éviter l'étalement du complexe de répression HIR-Rtt106 et ainsi limiter la répression des gènes d'histones (Fillingham *et al.* 2009). Inversement, pour favoriser la transcription, lorsque Yta7 est phosphorylée par Cdk1 (kinase cycline-dépendante) et Ck2 (kinase caséine 2 qui

phosphoryle de nombreuses protéines chez *S. cerevisiae*), cet état d'hyperphosphorylation mène à l'expulsion de Yta7 du locus *HTA1* et facilite la transcription des gènes d'histones à la fin de G1 et en phase S (Kurat *et al.* 2011). Il est proposé par le groupe du Dr. Brenda Andrews que Yta7 aurait un effet d'ancrage entre autres pour faciliter le recrutement de l'ARNPII au promoteur des gènes d'histones, mais que le facteur serait expulsé par la suite pour permettre la transcription une fois que l'ARNPII est localisée au promoteur (Kurat *et al.* 2011). Un fait intéressant et contradictoire est que des analyses d'épistasie ont démontré que Yta7 interagissait génétiquement avec des facteurs de transcription tels qu'Asf1-HIR mais également Spt16/yFACT qui est un activateur de transcription. Cependant, le rôle précis de ces interactions de Yta7 dans la transcription des gènes d'histones demeure encore inconnu (Gradolatto *et al.* 2008). De plus, Yta7 n'est pas absolument essentiel à la transcription des gènes d'histones, car le mutant *yta7Δ* est viable.

Promoteurs des gènes d'histones *Saccharomyces cerevisiae*

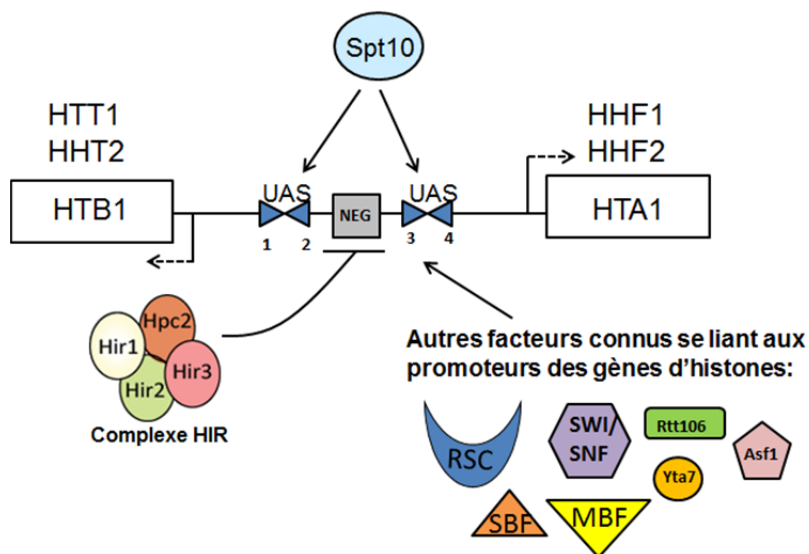


Figure I.4 Principaux facteurs qui se lient aux promoteurs des gènes d'histones chez *S. cerevisiae*

Les protéines Spt10, SBF/MBF, SWI/SNF et Yta7 sont des activateurs de la transcription des gènes d'histones, tandis que le complexe HIR, Rtt106 et le complexe remodeler RSC contribuent plutôt à la répression des gènes d'histones.

I.2.2. Répression des gènes d'histones

Il est important que les gènes d'histones soient réprimés en début G1 et en phase G2/M du cycle cellulaire afin d'éviter une accumulation des histones libres. Les histones libres ont une forte charge positive qui favorise leur liaison non-spécifique à l'ADN, à l'ARN et même à certaines protéines chargées négativement *in vivo* (Singh *et al.* 2010). Lors de la reconstitution de nucléosomes *in vitro*, un léger excès d'histones par rapport à l'ADN (< 5% d'excès) est suffisant pour mener à la formation d'agrégats insolubles (Steger and Workman 1999). Heureusement, toutes les chaperones d'histones portent des domaines polaires qui servent à neutraliser la charge positive des histones néo-synthétisées et d'éviter les interactions non-spécifiques des histones libres avec les acides nucléiques. Cette propriété des chaperones leur permet d'acheminer de manière efficace et rapide les histones néo-synthétisées aux sites d'assemblage de la chromatine afin d'assurer un équilibre parfait entre les nouvelles histones et l'ADN nouvellement répliqué (Mello *et al.* 2002). La cellule prévient l'excès d'histones et maintient la stœchiométrie entre les histones et l'ADN à l'aide de mécanismes agissant à plusieurs niveaux pour s'assurer de conserver l'intégrité génomique tout au long du cycle cellulaire. Le premier mécanisme qui sera abordé dans la section suivante est celui de la répression des gènes d'histones par le complexe HIR. Le deuxième mécanisme en est un de régulation post-transcriptionnelle impliquant la région 3' non-traduite (3'-UTR) des ARN messagers d'histones et le dernier permet à la cellule de dégrader les histones en excès.

I.2.2.1. Le complexe HIR chez *S. cerevisiae*

Le complexe HIR est composé de quatre protéines Hir1, Hir2, Hir3 (*histone regulatory*) et Hpc2 (*histone promoter control*) qui furent découvertes lors de cribles génétiques chez *S. cerevisiae* dont le but était d'identifier des mutations qui

perturbent la régulation des ARN messagers encodant les histones (Osley and Lycan 1987, Xu *et al.* 1992). Le complexe HIR est un répresseur d'*HTA1-HTB1*, *HHT1-HHF1* et *HHT2-HHF2*, mais pas d'*HTA2-HTB2* (Fillingham *et al.* 2009). Le complexe HIR réprime les gènes d'histones au début de la phase G1 et en G2/M, et en réponse aux dommages à l'ADN en phase S (Osley and Lycan 1987, Xu *et al.* 1992).

L'abondance des sous-unités du complexe HIR a été déterminée par chromatographie liquide haute performance (HPLC) combinée à la spectrométrie de masse (LC-MS) (Liu *et al.* 2004, Prochasson *et al.* 2005). Cette étude protéique révèle que les quatre protéines forment un complexe d'une taille moléculaire de 617.5 KDa. Ainsi, la stœchiométrie du complexe HIR correspond à une copie de Hir1 et Hir3 pour deux copies de Hir2 et Hpc2 (Green *et al.* 2005, Prochasson *et al.* 2005). La prochaine section décrira en détail les particularités structurales des sous-unités du complexe HIR et il sera également discuté de la fonction de chacun de leurs domaines (figure I.5).

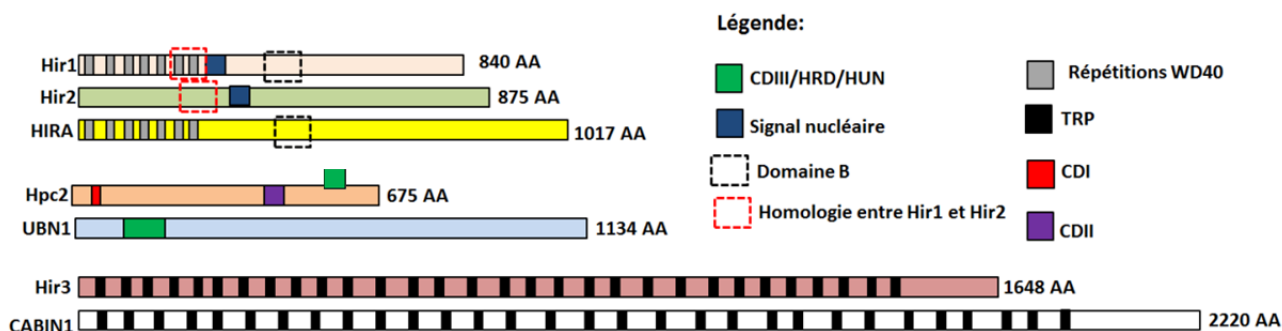


Figure I.5 Les domaines fonctionnels du complexe HIR

Les domaines d'interaction, le signal nucléaire et les répétitions WD40 propres aux différentes sous-unités du complexe HIR chez la levure et chez l'humain sont représentés sur ce schéma à l'aide d'encadrés de couleurs et de pointillés.

Chez la levure à bourgeonnement, la sous-unité Hir1 (840 acides aminés, de 93,8 kDa) est une protéine qui contient sept répétitions WD40 situées dans son domaine N-terminal (acides aminés 1 à 389) qui est nécessaire à la répression des gènes d'histones (Sherwood *et al.* 1993, Spector *et al.* 1997, DeSilva *et al.* 1998). Tel que suggéré par leur nom, les répétitions WD40 sont caractérisées par un motif tryptophane-acide aspartique qui se répète à tous les 40 résidus et qui serait nécessaire pour les interactions entre protéines (Neer *et al.* 1994). Hir1 possède un deuxième domaine de répression en C-terminal (acides aminés 390 à 840) (DeSilva *et al.* 1998). Ces deux domaines complètent la délétion du gène *HIR1* dans une souche *hir1Δ* et les deux domaines sont capables de réprimer la transcription du gène *HTA1* lorsque recrutés de façon artificielle au promoteur *HTA1* (DeSilva *et al.* 1998). Les sous-unités Hir1 (résidus 426 à 443) et Hir2 possèdent un signal de localisation nucléaire (résidus 454 à 472) (Sherwood *et al.* 1993). Le domaine N-terminal de Hir1 contenant les répétitions WD40 interagit avec le domaine HRD (*Hpc2-related domain*) de Hpc2 (Banumathy *et al.* 2009). De manière intrigante, la sous-unité Hir2 (875 acides aminés, 98 kDa) possède 62 acides aminés (résidus 300-361) qui sont identiques à ceux de Hir1 (résidus 282-343) (Sherwood *et al.* 1993). À ce jour, Hir2 ne possède pas de motif d'interaction et la manière dont Hir2 se lie aux autres partenaires du complexe HIR n'est pas claire. Toutefois, l'immunoprécipitation de la chromatine (ChIP) via Hir2-TAP dans des souches portant des délétions des gènes encodant les autres sous-unités du complexe HIR (*i.e.* *hir1Δ*, *hir3Δ* ou *hpc2Δ*), a démontré que lorsqu'une des protéines est absente, Hir2-TAP est absente du promoteur *HTA1-HTB1* et, par conséquent, les gènes *HTA1* et *HTB1* ne peuvent pas être réprimés. Les quatre protéines Hir/Hpc forment donc un complexe multi-protéique et les quatre sous-unités du complexe HIR doivent être présentes aux promoteurs des gènes d'histones pour les réprimer (Green *et al.* 2005). En ce qui concerne Hir3, cette sous-unité est la plus large du complexe HIR (648 acides aminés, 191,7 kDa). Une étude phylogénétique a identifié que certains domaines de Hir3, notamment ses 30 tétratricopeptides (TPR) servant aux interactions protéine-protéines, sont conservée chez les eucaryotes (Balaji *et al.* 2009). Chez la levure,

l'association de Hir3 avec Hir1 et Hir2 est dépendante d'Hpc2 (Green *et al.* 2005). De plus, la sous-unité Hpc2 (625 acides aminés, 67.8kDa) est une protéine très basique qui dispose d'un motif HRD (*Hpc2-Related Domain*) de cinquante acides aminés conservé de la levure à l'humain (Balaji *et al.* 2009). Le domaine HRD interagit à la fois avec Hir3, tel que mentionné précédemment, mais aussi avec Hir1 (Banumathy *et al.* 2009). Hpc2 possède également trois autres domaines CDI, CDII et CDIII ayant été découverts par analyses bio-informatiques de comparaison de séquences entre homologues d'Hpc2 chez plusieurs espèces différentes (Vishnoi *et al.* 2011). Le domaine CDI se situe entre les résidus 63 à 79. Lorsque cette région est mutée, on note un défaut de la répression des gènes d'histones qui se traduit par des niveaux élevés des ARNm *HTA1* et *HHF1* comparativement à la souche Hpc2 WT. Il est d'autant plus étonnant de constater qu'en l'absence du domaine CDI, la formation du complexe HIR n'est pas perturbée (Vishnoi *et al.* 2011). D'autre part, Vishnoi *et al.* ont observé par ChIP que l'absence du domaine CDI empêche le recrutement du complexe HIR aux promoteurs de gènes d'histones comme c'est le cas dans la souche *hpc2Δ* (Vishnoi *et al.* 2011). Le domaine C-terminal CDII d'Hpc2 (acides aminés 460 à 478), semble requis pour la stabilité de la protéine, car une diminution marquée de l'abondance d'Hpc2 est observée dans des essais d'immunoprécipitation de Hir2-TAP lorsque CDII est muté. De plus, la formation du complexe HIR s'avère impossible sans le domaine CDII (Vishnoi *et al.* 2011). Le domaine CDIII d'Hpc2, aussi appelé HRD (*Hpc2 Related Domain*) ou HUN (*Hpc2/Ubinuclein 1*), est essentiel pour l'interaction entre Hpc2 et Hir1 chez la levure ainsi que chez leurs orthologues humains UBN1 (*Ubinuclein 1*) et HIRA (*H1stone cell cycle Regulator homolog A*) respectivement (Banumathy *et al.* 2009, Vishnoi *et al.* 2011). En plus des protéines Hir1, Hir2, Hir3 et Hpc2 qui s'associent entre elles pour former le complexe HIR, d'autres protéines, telles les chaperones Rtt106 et Asf1 impliquées dans la déposition d'histones, se lient aussi au complexe HIR pour réprimer les gènes d'histones (Green *et al.* 2005, Fillingham *et al.* 2009, Ferreira *et al.* 2011). Le complexe remodelleur de la chromatine ATP-dépendent RSC (*Remodels the Structure of Chromatin*) aurait aussi un rôle à jouer dans la répression des gènes d'histones (Ng

et al. 2002). Une région d'environ 54 paires de base (pb) située aux promoteurs des gènes d'histones nommée élément *NEG* (*negative cis-acting element*) est un motif de reconnaissance qui permet à tous ces effecteurs d'être recrutés efficacement aux promoteurs des gènes d'histones (Osley *et al.* 1986).

1.2.2.2. Élément *NEG*

L'élément *NEG* se situe près des éléments UAS et contient un palindrome imparfait de 19pb nommé l'élément CCR (*cell-cycle-dependent repression*) (Freeman *et al.* 1992). La délétion de l'élément *NEG* du promoteur *HTA1-HTB1* résulte en une dérégulation transcriptionnelle de cette paire de gènes d'histones ainsi qu'une accumulation des ARNm d'histones (Osley *et al.* 1986, Marino-Ramirez *et al.* 2006). Trois des quatre paires de gènes d'histones (*HTA1-HTB1*, *HHT1-HHF1*, *HHT2-HHF2*) sont réprimées par le complexe HIR (Osley 1991, Spector *et al.* 1997). De manière intrigante, la paire de gènes d'histones *HTA2-HTB2* ne possède pas d'élément *NEG* et n'est donc pas sujette à la répression transcriptionnelle exercée par le complexe HIR. Malgré le fait qu'*HTA2-HTB2* n'est pas exprimé de façon constitutive au cours du cycle cellulaire, son mécanisme de répression HIR-indépendant n'est pas connu. L'élément *NEG* est requis pour la répression des gènes d'histones au début de la phase G1, en G2/M, ainsi qu'en réponse au dommage à l'ADN durant la phase S (Osley *et al.* 1986, Freeman *et al.* 1992, Spector *et al.* 1997). De manière intéressante, l'élément *NEG* confère une transcription dépendante des phases du cycle cellulaire lorsqu'inséré dans un promoteur constitutif (Osley *et al.* 1986). Le complexe HIR ne possède pas de domaine spécifique de liaison à l'ADN et donc une hypothèse a été émise selon laquelle un autre cofacteur lierait spécifiquement l'élément *NEG* et que le complexe HIR ne lierait pas directement l'élément *NEG* aux promoteurs des gènes d'histones. Cependant, cette hypothèse n'a toujours pas été confirmée puisqu'aucun facteur n'a été identifié à ce jour (DeSilva *et al.* 1998, Prochasson *et al.* 2005, Eriksson *et al.* 2012). Le complexe HIR peut aussi exercer sa fonction de répression sans l'élément *NEG* lorsqu'HIR est recruté

artificiellement aux promoteurs des gènes d'histones (Spector *et al.* 1997, DeSilva *et al.* 1998).

I.2.2.3. Les chaperones Asf1 et Rtt106 et la répression des gènes d'histones

Rtt106 (*Regulation of Ty1 Transposition 106*) fut décrit pour la première fois chez *Saccharomyces cerevisiae* dans un crible dont l'objectif était d'identifier des mutants chez lesquels la fréquence de mobilisation d'un transposon Ty1, normalement faible chez les cellules wild-type, était augmentée. Rtt106 exerce aussi un rôle au sein de l'hétérochromatine en imposant un silence transcriptionnel (*HTC silencing*) (Scholes *et al.* 2001, Huang *et al.* 2005). Des analyses cristallographiques ont permis de déterminer que Rtt106 est un homodimère dont les domaines de dimérisation appelés *PH-like* (*pleckstrin homology-like*) interagissent simultanément *in vitro* et *in vivo* avec l'acétylation de la lysine 56 (H3K56Ac) sur les deux molécules d'H3 faisant partie d'un même tétramère (H3-H4)₂ (Su *et al.* 2012, Zunder *et al.* 2012). Chez *S. cerevisiae*, Rtt106 est donc une chaperone d'histones qui escorte les histones nouvellement synthétisées pour les déposer sur l'ADN.

Le complexe HIR est assisté des cofacteurs Asf1 et Rtt106 lors de la répression des gènes d'histones (Sutton *et al.* 2001). Rtt106 localise aux promoteurs des gènes d'histones de manière dépendante d'Asf1 et du complexe HIR (Fillingham *et al.* 2009). La délétion du gène *RTT106* n'affecte pas la localisation du complexe HIR ni d'Asf1. Cependant, elle entraîne une dérégulation des gènes d'histones. Ce même phénotype étant observé lors de la délétion des gènes HPC/HIR donnant lieu à une région promotrice libre de nucléosomes (Fillingham *et al.* 2009). En effet, Rtt106 interagit physiquement avec les complexes remodeleurs RSC et SWI/SNF et son absence empêche le recrutement de ces complexes aux promoteurs des gènes d'histones causant le phénotype de perte de la répression (Ferreira *et al.* 2011).

I.2.2.4. Remodelage de la chromatine

Les histones qui sont déposées sur l'ADN par les chaperones permettent de compacter le génome. Cependant, afin de permettre la transcription des gènes et la réparation de l'ADN, cet état de compaction doit être réversible pour permettre l'accessibilité à l'ADN aux facteurs de transcription et de réparation (Narlikar *et al.* 2002). En effet, la chromatine est une entité dynamique et les complexes remodeleurs ATP-dépendants jouent un rôle important dans cette dynamique (Becker *et al.* 2002, Saha *et al.* 2002). Ce sont ces complexes qui assurent le maintien d'une architecture spécifique aux promoteurs des gènes d'histones par la composition des nucléosomes et par leur positionnement à la région promotrice (Cairns 2009). Lorsque réprimées, les régions promotrices des gènes d'histones font parties de la catégorie de promoteurs «couverts» par les nucléosomes contrairement aux gènes exprimés constitutivement qui possèdent des promoteurs «ouverts» restreints en nucléosomes (Field *et al.* 2008, Tirosh and Barkai 2008).

I.2.2.5. Les complexes remodeleurs de chromatine SWI/SNF et RSC

Les complexes remodeleurs de chromatine SWI/SNF et RSC font partie de la même famille de remodeleurs ATP-dépendants et ils utilisent l'énergie provenant de l'hydrolyse de l'ATP pour se déplacer le long de l'ADN (*ATP-dependent DNA translocase activity*) ce qui force la dissociation transitoire de contacts entre les histones et l'ADN (Saha *et al.* 2002). Cette activité permet, via plusieurs mécanismes, d'exposer à des régulateurs transcriptionnels (activateurs ou répresseurs) des séquences d'ADN qui ne sont pas accessibles lorsque l'ADN est enroulé à la surface de l'octamère d'histones (Saha *et al.* 2002, Wilson and Roberts 2011). Malgré le fait qu'ils possèdent des activités biochimiques similaires, SWI/SNF et RSC sont deux complexes ayant des rôles antagonistes dans la régulation des gènes d'histones, tel que discuté dans la présente section.

Le complexe remodelleur de chromatine SWI/SNF (*SWItch defective/Sucrose NonFermentive*) fut identifié chez la levure dans deux cribles indépendants de mutants affectant le changement de type sexuel (*mating type switching*) ou la croissance en présence de sucrose (Neigeborn and Carlson 1984, Peterson and Herskowitz 1992). Le complexe SWI/SNF chez la levure est composé de dix sous-unités : Swi1, Swi2/Snf2, Swi3, Snf5, Snf6, Snf11, Swp82, Rtt102, Arp9, Snf12, Taf14 et Arp7 formant un complexe multimérique d'environ 2 Méga Daltons (Cairns *et al.* 1994, Cote *et al.* 1994). La sous-unité Swi2/Snf2 possède le domaine catalytique ATPase du complexe et contient également un bromodomaine et un «AT-hook» (crochet-AT), un domaine qui se lie aux régions d'ADN riches en adénine et thymine (Laurent *et al.* 1993, Aravind and Landsman 1998). L'étude de la régulation du gène *PHO5*, un gène réprimé en présence de phosphate inorganique (Pi) et activé par déprivation de Pi, a permis de déterminer que le complexe SWI/SNF glisse le long du promoteur à partir du premier nucléosome en amont du site d'initiation de la transcription (nucléosome -1) et expulse les nucléosomes de l'ADN (Kaneko *et al.* 1982, Schmid *et al.* 1992, Yuan *et al.* 2005). Cette expulsion des nucléosomes résulte en une région ouverte au promoteur d'intérêt menant à un état d'activation du gène.

En ce qui concerne le complexe RSC, il est formé de 15 sous-unités dont Sth1 est l'enzyme qui catalyse l'hydrolyse de l'ATP (Du *et al.* 1998). Huit protéines du complexe possèdent un bromodomaine et se divisent en deux catégories : les protéines liant les queues N-terminales de l'histone H3 ou celles liant les queues N-terminales de l'histone H4 pour repositionner les nucléosomes (Kasten *et al.* 2004). L'existence de complexes RSC distincts a été suggérée puisque Rsc1 et Rsc2 s'associent aux autres protéines du complexe RSC de manière mutuellement exclusive (Cairns *et al.* 1999). Des études de localisation du complexe RSC à l'échelle génomique ont permis de montrer que le complexe RSC s'associe aux promoteurs des ARN de transfert (ARNt) et aux promoteurs de gènes transcrits par l'ARN polymérase II (ARNPII) (Ng *et al.* 2002). Aux promoteurs de gènes transcrits

par l'ARNPII, ce sont Rsc3 et Rsc30 du complexe RSC qui se lient l'ADN (Badis *et al.* 2008). Aux promoteurs de gènes d'histones, l'élément *NEG* est requis pour recruter le complexe RSC. La délétion de l'élément *NEG* abolit le recrutement du complexe au promoteur bidirectionnel *HTAI/HTBI* tandis que la délétion des éléments UAS n'affecte pas la localisation de RSC au promoteur (Ng *et al.* 2002).

De plus, le recrutement du complexe SWI/SNF est nécessaire avant l'initiation de la réplication de l'ADN, tandis que le complexe RSC est recruté pour promouvoir une chromatine répressive aux promoteurs des gènes d'histones en dehors de la phase S du cycle cellulaire (Dimova *et al.* 1999, Ng *et al.* 2002, Ferreira *et al.* 2011). Cependant, ces complexes remodeleurs exercent leur fonction d'organisation des nucléosomes globalement dans le génome. Puisque la présence de SWI/SNF ou de RSC n'est pas restreinte aux promoteurs de gènes d'histones, la collaboration de protéines qui se fixent aux promoteurs de gènes d'histones est requise pour faciliter leur recrutement. Il est à noter que le recrutement de SWI/SNF et RSC serait dépendant des régulateurs transcriptionnels Rtt106, Asf1 et HIR (Dimova *et al.* 1999, Ng *et al.* 2002, Ferreira *et al.* 2011). Ces protéines interagissent physiquement entre elles. Rtt106 interagit avec Hir2 et Asf1 avec Hir1 (Sutton *et al.* 2001, Green *et al.* 2005, Fillingham *et al.* 2009, Ferreira *et al.* 2011), mais Rtt106 serait la protéine qui recrute les complexes SWI/SNF et RSC aux promoteurs des gènes d'histones car la délétion de *RTT106* empêche le recrutement de SWI/SNF et RSC mais n'interfère pas avec la localisation du complexe HIR ni d'Asf1 (Fillingham *et al.* 2009, Ferreira *et al.* 2011). Néanmoins, le complexe HIR et Rtt106 ont un rôle important à jouer dans la répression des gènes d'histones puisque la délétion des gènes encodant ces protéines entraîne une dérégulation des gènes d'histones.

I.2.2.6 Le complexe HIR et ses autres fonctions dans la régulation de la chromatine

I.2.2.6.1 Assemblage des nucléosomes

En plus de son rôle dans la répression des gènes d'histones, le complexe HIR est une chaperone qui module la structure de la chromatine en y déposant les histones requises pour l'assemblage de nucléosomes indépendant de la réplication de l'ADN (Green *et al.* 2005). En effet, Green et ses collègues ont utilisé le complexe HIR ainsi que des histones H2A/H2B et H3/H4 purifiées pour démontrer que le complexe est capable de générer la formation de nucléosomes sur un plasmide en absence de réplication *in vitro* (Green *et al.* 2005). De plus, le groupe du Dr. Jerry Workman a démontré par un essai de retard sur gel (*electrophoretic mobility shift assay* ou *EMSA*) que le complexe HIR lie spécifiquement les histones H3/H4 et non les histones H2A/H2B (Prochasson *et al.* 2005). Par conséquent le complexe HIR est une chaperone d'histones H3/H4 qui permet l'assemblage de nucléosomes réplication - indépendant (Prochasson *et al.* 2005). Le complexe HIR interagit également avec la chaperone d'histones H3/H4 Asf1. Cette interaction contribue à stimuler l'assemblage des nucléosomes puisqu'un mutant Asf1-H36A D37A incapable de se lier avec le complexe HIR perd significativement sa capacité à assembler des nucléosomes (Green *et al.* 2005). Le promoteur *PHO5* est utilisé couramment comme modèle pour les études d'assemblage de nucléosomes tel que mentionné dans la section I.2.2.5. (Korber and Barbaric 2015). Tel qu'observé par immunoprécipitation de la chromatine (ChIP) à l'aide d'anticorps contre l'histone H3 non-modifiée ou contre H3-Myc ou H3-Flag, des souches arborant une délétion *asf1Δ* ou une délétion *hir1Δ* montrent un délai marqué dans le réassemblage des nucléosomes lors de la répression du promoteur *PHO5* (Schermer *et al.* 2005). Ces expériences sont effectuées dans des cellules arrêtées en G1, ce qui démontre qu'Asf1 et Hir1 sont capables d'assembler des nucléosomes de manière réplication-indépendante *in vivo* (Schermer *et al.* 2005).

Le complexe HIR est conservé de la levure jusqu'à l'être humain. Chez *S. cerevisiae*, les sous-unités Hir1 et Hir2 sont les orthologues de HIRA chez plusieurs organismes pour ne nommer que *Drosophila melanogaster*, les amphibiens (*Xenopus*) et l'être humain (Balaji *et al.* 2009). Les autres sous-unités du complexe HIR sont aussi conservées de la levure à l'humain (Rai *et al.* 2011). Contrairement aux levures, l'être humain possède au moins trois formes de l'histone H3. H3.1 et H3.2 qui sont strictement déposées sur l'ADN de manière réplication-dépendante (Tagami *et al.* 2004). Au contraire, la variante H3.3, qui ne diffère d'H3.1 ou H3.2 que par quelques acides aminés, n'est utilisée que pour l'assemblage de chromatine réplication-indépendant (Pchelintsev *et al.* 2013). L'homologue de HIRA chez la drosophile est nécessaire pour le remplacement des protamines, une famille de protéines nécessaires pour condenser l'ADN dans le gamète paternel, par l'assemblage réplication-indépendant de nucléosomes contenant H3.3 suite à la fertilisation (Loppin *et al.* 2005). Par exemple, la mutation K225R connue sous le nom de mutation Sésame empêche la fonction d'HIRA et bloque le remplacement des histones des nucléosomes, ce qui cause une perte de viabilité avant la première division cellulaire suivant la fusion des gamètes (Loppin *et al.* 2005). La mutation Sésame n'affecte pas l'interaction d'HIRA avec Asf1, mais elle affecte son interaction avec Yemanuclein (YEM, orthologue chez la levure de Hpc2) (Orsi *et al.* 2013). Cette interaction HIRA/YEM serait essentielle dans l'assemblage des nucléosomes dans la chromatine des pro-noyaux paternels (Ait-Ahmed *et al.* 1992, Banumathy *et al.* 2009, Orsi *et al.* 2013). Des effets comparables ont également été observés chez d'autres organismes comme la carpe allemande (*Carassius auratus gibelio*), notamment dans l'incapacité des spermatozoïdes à décondenser leur chromatine en l'absence d'HIRA (Zhao *et al.* 2011). Bref, toutes les sous-unités qui composent le complexe HIR sont requises pour rendre le complexe fonctionnel afin de remplir ses fonctions de chaperone d'histones lors de l'assemblage des nucléosomes en dehors de la réplication, et ce, peu importe l'organisme étudié.

I.2.2.6.2. L'hétérochromatine et le *silencing* transcriptionnel

Tel qu'abordé dans la section I.1.2.3, l'hétérochromatine est une forme de chromatine dont la structure est condensée et généralement réfractaire à la transcription (Brown 1966, Sager and Kitchin 1975). Cette région est transcriptionnellement réprimée et plusieurs enzymes contribuent à établir et à transmettre l'état de *silencing* et la structure de l'hétérochromatine des cellules parentales aux cellules filles (Aparicio *et al.* 1991, Monson *et al.* 1997, Enomoto and Berman 1998, Kaufman *et al.* 1998). Au delà de sa fonction dans le *silencing* transcriptionnel, l'hétérochromatine contribue à préserver l'intégrité génomique en évitant la recombinaison indésirable entre les éléments transposables ou les séquences répétitives (Gottschling *et al.* 1990, Amin *et al.* 2013). De plus l'hétérochromatine péricentromérique permet d'assurer la ségrégation égale de chaque paire de chromatides sœurs entre les cellules filles (Pidoux and Allshire 2004).

HIR est un des nombreux complexes ayant une fonction importante dans la régulation de la structure de l'hétérochromatine. Chez *S. cerevisiae* les doubles mutants où les complexes HIR et CAF-1 sont tous deux inactivés par des mutations ont un défaut de *silencing* beaucoup plus fort que celui observé chez les cellules où seulement CAF-1 est inactivé (Kaufman *et al.* 1998). Ce phénotype est observé par l'insertion d'un gène rapporteur au sein de l'hétérochromatine télomérique ou péricentromérique. Par exemple, chez *S. cerevisiae* un gène rapporteur est exprimé lorsque présent dans l'euchromatine. Or, ce même gène rapporteur sera soumis au *silencing* transcriptionnel suite à son incorporation sous forme d'hétérochromatine télomérique (Gottschling *et al.* 1990). Le fait que le même gène rapporteur soit exprimé ou réprimé dépendamment de sa position dans l'euchromatine ou l'hétérochromatine télomérique est appelé effet de positionnement télomérique (dérivé de l'anglais *telomeric position effect*: TPE). De manière consistante avec son défaut de *silencing* de gènes rapporteurs intégrés près de télomères, une souche double mutante où les complexes HIR et CAF-1 sont absents montre des défauts structuraux de la

chromatine télomérique mesurés par une accessibilité accrue de l'ADN à des nucléases et méthyltransférases (Kaufman *et al.* 1998, Sharp *et al.* 2002).

La fonction de CAF-1 dans la déposition d'histones H3/H4 néo-synthétisées derrière les fourches de réplication est strictement dépendante d'une interaction directe entre CAF-1 et PCNA (*Proliferating Cell Nuclear Antigen*). Certaines mutations ponctuelles de PCNA qui abolissent son interaction avec CAF-1 *in vitro* et *in vivo* causent un défaut de *silencing* télomérique quasi-identique en terme de magnitude à celui observé dans une souche où CAF-1 est inactivé par délétion des gènes encodant l'une ou l'autre de ces trois sous-unités: Cac1, Cac2 ou Cac3 (Sharp *et al.* 2001). De manière intéressante, des mutations ponctuelles de PCNA différentes de celles qui bloquent son interaction avec CAF-1 empêchent le complexe Asf1/HIR de contribuer au *silencing* télomérique (Sharp *et al.* 2001). De plus, la combinaison d'une mutation ponctuelle de PCNA qui bloque la contribution du complexe Asf1/HIR avec une délétion de gènes encodant les sous-unités de CAF-1 résulte en un défaut de *silencing* télomérique beaucoup plus prononcé que celui observé dans chacun des simples mutants. Ces résultats suggèrent fortement que le complexe Asf1/HIR possède une fonction redondante à CAF-1 dans le *silencing* de gènes rapporteurs médié par l'hétérochromatine télomérique (Sharp *et al.* 2001).

I.2.2.6.3. Parallèle entre le complexe HIR chez la levure et l'être humain

Il est intéressant de s'attarder au fait que le complexe HIR est conservé au cours de l'évolution et que l'être humain possède un complexe homologue au complexe HIR de levure. Cette présente section traite en détail des similarités et différences du complexe humain par rapport au complexe HIR de levure, tant au niveau structurel que fonctionnel ainsi que de l'importance du complexe HIR pour la régulation de la structure chromatiniennne chez l'humain.

Tel qu'abordé brièvement dans la section I.2.2.1, la protéine HIRA chez l'humain est l'homologue des sous-unités Hir1 et Hir2 du complexe HIR de *S. cerevisiae*; la partie N-terminale d'HIRA correspondant à Hir1 et la partie C-terminale à Hir2 (Lamour *et al.* 1995). Le gène *HIRA* de l'humain fut d'abord identifié à la suite d'études de cartographie génétique dont l'objectif était de découvrir le(s) gène(s) dont la mutation contribue à la maladie de DiGeorge., un syndrome d'haploinsuffisance causé par la microdélétion d'un segment de la région 22q11.2 sur l'une des deux copies du chromosome 22. Le gène *HIRA* fait partie d'un groupe de 35 gènes qui font partie du segment délété chez la vaste majorité des patients souffrant du syndrome de DiGeorge ainsi que d'un spectre de d'autres syndromes similaires appelés syndrome de délétion 22q11.2 (Halford *et al.* 1993, Lamour *et al.* 1995). Par exemple, le syndrome de DiGeorge et le syndrome de Shprintzen (vélocardiofacial) sont associés entre autres avec des anomalies du développement facial, une cardiopathie, une endocrinopathie et une hypoplasie du thymus causant un déficit immunitaire important (Maggadottir and Sullivan 2013). Le gène dont l'haploinsuffisance est responsable pour la majorité des manifestations cliniques du syndrome de DiGeorge s'est en fait avéré être *TBX1*, un gène qui encode un facteur dont la fonction n'est pas du tout reliée à celle d'HIRA (Kobrynski and Sullivan 2007). Au niveau moléculaire, HIRA s'associe avec le facteur de transcription Pax3 et les histones, ce qui suggère un rôle pour HIRA dans la régulation transcriptionnelle, possiblement via son rôle de chaperone d'histones (Magnaghi *et al.* 1998, Ray-Gallet *et al.* 2002). *S. cerevisiae* ne possède qu'une seule forme majeure de l'histone H3 dont la séquence s'apparente plus à celle d'H3.3 qu'à H3.1/H3.2 chez les vertébrés. Le complexe HIR de *S. cerevisiae* dépose sur l'ADN des molécules qui s'apparentent à H3.3 de manière réplication-indépendante suggérant fortement qu'HIRA puisse agir comme chaperone d'H3.3 chez l'humain (Baxevanis and Landsman 1998, Green *et al.* 2005). Cette hypothèse s'est avérée correcte. En effet, HIRA fait partie du complexe HIR humain qui interagit de façon hautement spécifique avec les molécules d'H3.3 (plutôt que les variantes réplication-dépendantes H3.1/H3.2) et qui dépose sur l'ADN des complexes composés des histones H3.3/H4, et ce, indépendamment de la synthèse d'ADN

(Grove and Zweidler 1984, Tagami *et al.* 2004, Loppin *et al.* 2005, Nakayama *et al.* 2007, van der Heijden *et al.* 2007). HIRA possède un domaine de cinquante acides aminés, appelé domaine "B", qui forme une structure en épingle à cheveux bêta (Tang *et al.* 2006). Le domaine B d'HIRA, particulièrement les résidus 439 à 475, interagit avec la partie N-terminale d'ASF1a (Kirov *et al.* 1998, Zhang *et al.* 2005, Tang *et al.* 2006). De plus, la région N-terminale contenant les répétitions WD40 d'HIRA interagit *in vitro* avec le domaine HRD (*Hpc2-related domain*) d'UBN1 et d'UBN2, les orthologues humains d'Hpc2 (Banumathy *et al.* 2009). UBN1 et UBN2 sont exprimées dans plusieurs types de cellules primaires et cancéreuses entre autres dans des fibroblastes WI38 et IMR90 et des cellules cancéreuses M14 (mélanome) et MCF7 (carcinome du sein) (Banumathy *et al.* 2009). Banumathy et ses collègues ont identifié par des analyses d'alignements de séquences que la protéine FLJ25778 (nommée UBN2) possédait un domaine HRD tout comme UBN1 (Banumathy *et al.* 2009). Néanmoins, la fonction d'UBN1 est beaucoup plus étudiée que celle d'UBN2, c'est pourquoi les expériences subséquentes décrites dans cette section concernent principalement la fonction d'UBN1. Puis, la protéine appelée CABIN1 (CBN1) chez l'humain a été identifiée comme orthologue de *S. cerevisiae* Hir3 (Rai *et al.* 2011). Le domaine TRP de CBN1 est conservé de la levure jusqu'à l'humain et interagit avec le domaine WD40 de HIRA pour former le complexe HIRA/UBN1/CBN1/ASF1a (complexe HUCA, dont la composition en polypeptides est clairement similaire à celle du complexe HIR chez *S. cerevisiae*) (Banumathy *et al.* 2009, Rai *et al.* 2011).

En plus des interactions physiques entre les différents membres du complexe HUCA et H3.3, des analyses de localisation d'HIRA, UBN1 et ASF1a par immunoprécipitation de la chromatine suivi de séquençage d'ADN (ChIP-seq), effectuées dans la lignée cellulaire HeLa, ont permis de démontrer qu'UBN1 et ASF1a co-localisent à 74% avec les pics d'abondance d'HIRA observés sur l'ensemble du génome (Pchelintsev *et al.* 2013). De plus, 95% des sites où se retrouvent HIRA, UBN1 et ASF1a, sont des régions riches en histone H3.3

(Pchelintsev *et al.* 2013). De surcroît, l'enrichissement en histones H3.3 coïncide avec les sites d'initiation de la transcription (TSS: *Transcription Start Sites*) de gènes ainsi que le long des gènes transcrits activement. Le fait que le complexe HIRA/UBN1/ASF1a soit abondant aux régions où la chromatine est «ouverte» pour la transcription est consistant avec plusieurs études ayant montré que ces régions sont sujettes à des cycles dynamiques d'assemblage et de désassemblage de nucléosomes (Ahmad and Henikoff 2002, McKittrick *et al.* 2004, Chow *et al.* 2005, Jin and Felsenfeld 2007, Goldberg *et al.* 2010, Pchelintsev *et al.* 2013).

Il est important de noter que HUCA n'est pas le seul complexe servant de chaperone pour incorporer H3.3 sur l'ADN. À l'instar de HUCA, les protéines DAXX (*death associated protein*) et ATRX (*alpha-thalassemia/mental retardation X-linked syndrome*) font partie d'un complexe possédant une activité de chaperone d'histones H3.3. Le complexe contenant DAXX et ATRX possède la particularité de lier des dimères H3.3-H4 (Wong *et al.* 2009, Drane *et al.* 2010, Goldberg *et al.* 2010, Lewis *et al.* 2010, Delbarre *et al.* 2013). DAXX/ATRX et HUCA sont en partie présents dans les corps nucléaires PMLs (*Promyelocytic Leukaemia core bodies*). Delbarre et ses collègues suggèrent que les corps nucléaires PMLs servent de «centres de triage» pour l'attribution d'histones aux chaperones (Delbarre *et al.* 2013). DAXX/ATRX et HUCA sont situées à des régions mutuellement exclusives dans le génome, notamment ATRX est spécifiquement requis pour l'enrichissement d'H3.3 aux télomères et HUCA se retrouve à la fois aux gènes actifs et réprimés dans des cellules souches embryonnaires (ES) humaines (Goldberg *et al.* 2010). Ces résultats suggèrent que les chaperones HUCA et DAXX/ATRX déposent des complexes d'histones H3.3/H4 à des loci génomiques propres à chacun des complexes (Goldberg *et al.* 2010, Lewis *et al.* 2010).

Par ailleurs, la surexpression d'HIRA dans une lignée cellulaire U2OS résulte en une répression des gènes d'histones H2A, H2B, H3 et H4 ainsi que de l'histone H1 (Nelson *et al.* 2002). Ce résultat suggère un rôle d'HIRA dans la répression transcriptionnelle des gènes d'histones, de manière analogue au complexe HIR de *S. cerevisiae*, mais cette hypothèse devra être testée par des expériences additionnelles afin de voir si elle s'avère correcte ou non. HIRA est phosphorylée *in vitro* sur la thréonine 555 (T555) par la kinase CyclinA/Cdk2 et la surexpression d'HIRA entraîne un arrêt des cellules en phase S, ce qui suggère un rôle pour HIRA dans le contrôle du cycle cellulaire (Hall *et al.* 2001).

Une fonction mieux connue du complexe HUCA est son implication dans la répression de gènes qui stimulent la prolifération cellulaire. Entre autres, ces gènes sont exprimés après la surexpression inappropriée d'oncogènes, une condition qui, de manière contre-intuitive, déclenche la sénescence (Braig *et al.* 2005, Banumathy *et al.* 2009, Rai *et al.* 2011). La sénescence cellulaire est un mécanisme anti-prolifératif caractérisé par un arrêt de prolifération irréversible en phase G0 et une condensation globale des chromosomes qui se retrouvent confinés dans des foyers appelés SAHF (*senescence-associated heterochromatin foci*) (Stein *et al.* 1991, Serrano *et al.* 1997, Narita *et al.* 2003, Zhang *et al.* 2005, Sarkisian *et al.* 2007). Lorsque des cellules sénescents humaines sont colorées avec le 4'-6-diamidino-2-phenylindole (DAPI), il est possible d'apercevoir dans le noyau cellulaire de 30 à 50 foyers où l'ADN est beaucoup plus condensé que l'ADN de cellules normales en interphase (Narita *et al.* 2003). La sénescence peut également être déclenchée par d'autres facteurs tels qu'un stress oxydatif, le dommage à l'ADN ou l'érosion des télomères (Wright and Shay 2002, Campisi 2005, Herbig and Sedivy 2006). Lors de la formation des SAHFs induits par la surexpression d'oncogènes, il est clair qu'HIRA se retrouve, en grande partie, dans les corps PMLs (Zhang *et al.* 2005). Ce phénomène fut initialement observé grâce à un vecteur rétroviral permettant la surexpression d'une forme constitutivement active de l'oncogène Ras (RasV12) dans des cellules diploïdes

humaines WI38 pré-sénescentes (Zhang *et al.* 2005). De plus, les cellules sénescentes qui sont marquées par la présence d'un isoforme de β -galactosidase (SA β -gal: *Senescence-Associated* β -gal), un marqueur associé à la sénescence, présentent ASF1a et HIRA comme des partenaires d'interaction qui, en analyses d'immunofluorescence (IF), co-localisent dans les foyers SAHFs (Dimri *et al.* 1995, Zhang *et al.* 2005, Zhang *et al.* 2007). Une hypothèse qui a été suggérée est que le complexe HIRA/ASF1a contribue à la formation des SAHFs grâce à son action sur la structure de la chromatine via sa fonction d'assemblage de nucléosomes réplication-indépendant (Adkins *et al.* 2004, Adams 2007, Zhang *et al.* 2007, Rai *et al.* 2014).

Chez les cellules humaines, les suppresseurs de tumeurs pRB et p53 sont essentiels à l'activation de la sénescence, à la répression des gènes prolifératifs et à la formation de SAHFs. Malgré le fait que pRB (*Retinoblastoma protein*) et p53 ne sont pas requis pour le recrutement d'HIRA aux corps PMLs, ils sont nécessaires au recrutement d'HIRA/Asf1a aux SAHFs (Narita *et al.* 2003, Ye *et al.* 2007). En outre, la protéine Wnt, qui est au cœur d'une voie de signalisation assurant la prolifération et la division cellulaire et qui inhibe l'apoptose, est réprimée dans les cellules sénescentes (Reya and Clevers 2005, Ye *et al.* 2007). Cette répression de la voie de signalisation Wnt permet à la kinase GSK3 β de phosphoryler HIRA sur la sérine 697, ce qui permet le recrutement d'HIRA au sein des corps PMLs (Ye *et al.* 2007).

Plusieurs autres protéines et propriétés de la chromatine caractérisent les SAHFs, telles la protéine HP1 (*Heterochromatin Protein 1*), l'hypoacétylation des histones, les histones H3 méthylées sur la lysine 9 (H3K9Me) et la variante d'histones MacroH2A nécessaires au maintien d'une forme d'hétérochromatine répressive (Maison and Almouzni 2004, Zhang *et al.* 2005). Mais qu'en est-il des autres membres du complexe HIRA/ASF1a, c'est-à-dire UBN1/2 et CBN1? Ont-ils un rôle

à jouer dans la formation des SAHF's? Suite à l'induction de la sénescence par surexpression de RASV12, UBN1 et ASF1a sont recrutées au gène encodant la cycline A2. Ceci suggère qu'UBN1 et ASF1a favorisent une hétérochromatine répressive à ce locus (Banumathy *et al.* 2009). De plus, les histones H3 des nucléosomes situés au gène de la cycline A sont fortement méthylés sur la lysine 9 (H3K9Me) et un possible lien existerait entre l'activité méthyltransférase menant à la méthylation de H3K9 et UBN1, puisqu'UBN1 n'interagit pas avec l'histone recombinante H3K9R (lysine 9 substituée par une arginine) contrairement à l'histone H3 WT ou K4R ou K27R *in vitro* (Banumathy *et al.* 2009). La surexpression d'UBN1 ou de CBN1 réduit significativement la prolifération de fibroblastes humains et augmente considérablement l'abondance de la SA β -gal et du nombre de SAHF's indiquant un rôle pour UBN1 et CBN1 dans la formation des SAHF's, comme c'est le cas pour les deux autres membres du complexe HUCA, HIRA et ASF1a (Banumathy *et al.* 2009, Rai *et al.* 2011). On peut donc conclure que, lors de la sénescence, le complexe HUCA possède un rôle dans la répression de la transcription de gènes de prolifération médiée par la formation d'hétérochromatine aux SAFH's.

1.2.2.6.4. Élongation transcriptionnelle et répression des promoteurs cryptiques

Le complexe FACT (*FAcilitates Chromatin Transcription*) est conservé de la levure jusqu'à l'être humain. Chez *S. cerevisiae* FACT est composé des sous-unités protéiques Spt16 (aussi connue sous le nom Cdc68) et Pob3 qui fonctionnent de concert avec Nhp6A et Nhp6B (Brewster *et al.* 2001, Formosa 2003). FACT facilite le passage de l'ARNPII, mais aussi de la machinerie de réplication, à travers la chromatine par le désassemblage transitoire des nucléosomes (Malone *et al.* 1991, Rowley *et al.* 1991, Orphanides *et al.* 1998, John *et al.* 2000, Schlesinger and Formosa 2000). FACT participe également à la reformation des nucléosomes derrière l'ARNPII et est considéré comme une chaperone d'histones H2A/H2B et H3/H4 (Belotserkovskaya *et al.* 2003, VanDemark *et al.* 2008). Dans des cellules où FACT

est complètement fonctionnel, le complexe HIR n'est pas essentiel pour la viabilité des cellules. Cependant, des cribles génétiques ayant pour objectif de trouver des mutations qui causent une létalité synthétique lorsque combinées avec des mutations hypomorphes des gènes *SPT16* ou *POB3* ont identifié les gènes encodant les quatre sous-unités du complexe HIR ainsi qu'*Asf1* comme des protéines essentielles lorsque FACT est altéré (Lejeune *et al.* 2007). L'interprétation de ces résultats génétiques faite par Formosa et collègues est que, lorsque la fonction de FACT pour la restauration de la structure chromatinienne après le passage de RNAPII est atténuée, l'assemblage de nucléosomes réplication-indépendant par *Asf1* et HIR devient essentiel pour la viabilité cellulaire (Formosa *et al.* 2002). De plus, chez *S. cerevisiae* les délétions des gènes *ASF1* ou *HIR1* sont synthétiques létales lorsque combinées avec les délétions de gènes encodant des protéines impliquées dans l'élongation de la transcription telles que *Paf1*, *Spt4*, *Spt5* et *Spt6* (Formosa *et al.* 2002). De surcroît, la double délétion de *Spt2* (aussi impliquée dans l'élongation) avec le complexe HIR (*i.e.* *Hir1* et *Hir2*) affecte la croissance des levures comparativement aux souches possédant la simple mutation *spt2Δ* ou *hirΔ* suggérant que ces protéines ne font pas partie de la même voie génétique, mais qu'elles auraient toutes deux un rôle dans la régulation de la transcription (Nourani *et al.* 2006). Nourani et ses collègues ont également observé par CHIP que le complexe HIR se retrouve physiquement au gène *GALI* induit par le galactose et transcrit activement (Nourani *et al.* 2006). Ces résultats suggèrent donc que le complexe HIR est impliqué dans l'assemblage de nucléosomes derrière les ARN polymérase.

Des segments d'ADN relativement longs et dépourvus de nucléosomes peuvent être générés par un défaut de réassemblage de nucléosomes derrière l'ARNPII. Ces segments où l'ADN est anormalement exposé par l'absence de nucléosome, peuvent contenir des sites cryptiques d'initiation de la transcription; c'est-à-dire des sites d'initiation de transcription intra-génique qui ne sont que rarement ou jamais utilisés lorsque l'ADN contenant ces séquences n'est pas accessible en raison de la présence

de nucléosomes (Winston *et al.* 1984). Les transcrits cryptiques qui émanent de sites d'initiation intra-génique sont potentiellement dommageables pour la cellule (Cheung *et al.* 2008). Le complexe HIR empêcherait la formation des transcrits cryptiques probablement via un mécanisme d'assemblage des nucléosomes aux régions cryptiques, car les mutants *hir/hpc* arborent un phénotype Spt-, c'est-à-dire que l'inhibition de la transcription cryptique est levée (Xu *et al.* 1992). Enfin, lorsque le domaine CDI en N-terminal d'Hpc2 est muté, le complexe HIR perd sa fonction de répression des gènes d'histones, mais la répression des transcrits cryptiques est toujours observée (Vishnoi *et al.* 2011). Il y a donc séparation-de-fonction d'Hpc2 du complexe HIR.

I.2.2.6.5. Centromères et ségrégation des chromosomes

Chez *Saccharomyces cerevisiae*, chaque centromère possède une région de 125 pb d'ADN dont les nucléosomes contiennent une variante de l'histone H3 spécifique au centromère, l'histone Cse4 (CenH3/CENP-A chez l'humain) (Bloom and Carbon 1982, Bloom 1993, Hyman and Sorger 1995, Stoler *et al.* 1995, Lawrimore *et al.* 2011). Effectivement, un nucléosome centromérique est composé d'un octamère d'histones qui contient deux copies de chacune des histones H2A, H2B, H4 et Cse4 qui remplace la forme canonique de l'histone H3 (Camahort *et al.* 2009). *S. cerevisiae* Scm3 (hJURP chez l'humain) est la chaperone qui dépose Cse4 aux centromères (Camahort *et al.* 2007, Mizuguchi *et al.* 2007, Stoler *et al.* 2007). Il a été mis de l'avant par Sharp et ses collègues que les facteurs CAF-1 et le complexe HIR pouvaient avoir un rôle dans l'assemblage des nucléosomes aux centromères (Sharp *et al.* 2002). De ce fait, il a été démontré par des analyses de cytométrie en flux qu'une souche *cacΔ hirΔ* a un délai prononcé d'entrée en anaphase par rapport aux simples mutants *cacΔ* ou *hirΔ* et à la souche WT (Sharp *et al.* 2002). De plus, ce délai est dû à l'activation du point de contrôle du fuseau mitotique (PCFM) puisque la délétion du gène encodant Mad2 (une protéine essentielle au bon fonctionnement du PCFM) dans la souche *cac1Δ hir1Δ* diminue le délai d'entrée en anaphase, mais ceci

cause une augmentation de la fréquence de défauts de ségrégation des chromatides sœurs en mitose (Sharp *et al.* 2002). Des expériences d'immunofluorescence (IF) montrent que la souche *cac1Δ hir1Δ* arbore plusieurs foyers de Cse4-HA plutôt qu'un ou deux comparativement à la souche WT ou dans les souches avec une simple délétion (Sharp *et al.* 2002). En effet, chez *S. cerevisiae* les cellules haploïdes contiennent 16 chromosomes mais, en général, un seul gros foyer de protéines du kinétochore n'est détectable par IF (Guacci *et al.* 1997, Meluh *et al.* 1998). De plus, une localisation inappropriée de Cse4 à la chromatine non-centromérique est observée par IF et cet étalement de Cse4 est également confirmé par CHIP de Cse4-HA (Lopes da Rosa *et al.* 2011). Enfin, tel que visualisé par des expériences d'IF conduites sur des étalements de chromosomes, les sous-unités Cac1 et Cac2 de CAF-1 et Hir1 du complexe HIR co-localisent aux «clusters» de centromères avec Ndc10, une protéine présente à chaque kinétochore. Ce résultat suggère une fonction pour CAF-1 et le complexe HIR au kinétochore (Sharp *et al.* 2002). Le kinétochore est une structure spécialisée formée au centromère de chaque chromosome qui assure l'attachement des chromosomes aux microtubules en mitose (Meluh and Koshland 1997, Henikoff and Dalal 2005). Une localisation appropriée et une stœchiométrie normale des histones constituant les nucléosomes centromériques et péri-centromériques, de par leur assemblage adéquat, est garant de la formation appropriée du kinétochore pour permettre la ségrégation des chromosomes de façon efficace pendant la mitose (Au *et al.* 2008).

I.2.3 Régulation post-transcriptionnelle des gènes d'histones

La régulation post-transcriptionnelle des gènes d'histones est médiée, tout au moins en partie, par le contrôle de la demi-vie des ARN messagers d'histones durant le cycle cellulaire (Lycan *et al.* 1987). De manière similaire à la répression des gènes d'histones par le complexe HIR qui se produit en G2 (afin d'éviter la production d'histones en excès), la dégradation des ARNm d'histones survient à la fin de la phase S, ou même parfois durant la phase S lorsque la vitesse totale de synthèse d'ADN est

fortement ralentie, par exemple en réponse aux dommages à l'ADN engendrés par des agents génotoxiques ou des inhibiteurs de la réplication (Sittman *et al.* 1983, Pandey and Marzluff 1987, Harris *et al.* 1991).

Chez les métazoaires, la transcription et la maturation des ARN messagers d'histones se produisent au sein de foyers (*histone locus bodies*) contenant les multiples copies de gènes encodant chacun des types majeurs d'histones (H2A, H2B, H3 et H4) exprimés de manière réplication-dépendante (Nizami *et al.* 2010). Chez les vertébrés, les ARNm encodant les histones réplication-dépendantes sont les seuls ARNm transcrits par l'ARNPII qui ne sont pas polyadénylés mais, via des événements de maturation, acquièrent plutôt une extrémité 3' constituée d'une structure en tige et boucle (*stem-loop*) de 25-26 nucléotides (Dominski and Marzluff 1999, Marzluff *et al.* 2008). Cette structure en tige et boucle des ARNm réplication-dépendantes se lie à la protéine SLBP (*stem-loop-binding protein*) qui est essentielle à toutes les étapes du métabolisme des ARNm d'histones menant à leur traduction pour ne nommer que la maturation, la stabilisation et l'export de ces ARNm dans le cytoplasme (Dominski and Marzluff 1999). De façon surprenante, la liaison de SLBP à cette structure est aussi requise pour la dégradation de ces ARNm d'histones (Mullen and Marzluff 2008). Les ARNm encodant les variantes d'histones (e.g. H2A.Z, H2AX, H2A.Bbd, H3.3, CenH3/CENP-A) ne se terminent pas en tige et boucle mais sont polyadénylés tels que les autres ARNm transcrits par l'ARNPII (Marzluff *et al.* 2008, Bonisch and Hake 2012). Cette tige et boucle à l'extrémité 3' des ARNm encodant les histones réplication-dépendantes est le seul élément requis pour leur dégradation, nécessaire afin d'éviter tout excès d'histones néfaste à la cellule lorsque la réplication de l'ADN est ralentie via l'activation du point de contrôle intra-S (voir section I.2.6) ou complétée (phase G2) (Pandey and Marzluff 1987, Harris *et al.* 1991). Durant la première étape conduisant à la dégradation des ARNm d'histones, le facteur d'initiation de la traduction CTIF (*Cap-binding complex-dependent translation initiation factor*) qui lie SLBP sur l'ARNm d'histone est remplacé par le facteur Upf1

(*Up-frameshift 1*) qui interagit fortement avec SLBP à la boucle des ARNm d'histones (Choe *et al.* 2014). Upf1 participe au mécanisme de surveillance des ARNm arborant des codons de terminaison prématurés pour mener à leur dégradation (Lykke-Andersen *et al.* 2000). Il est donc intéressant qu'Upf1 ait une fonction dans la dégradation d'ARNm normaux, c'est-à-dire des ARNm qui ne possèdent pas de codons de terminaison prématurés tels les ARNm d'histones. Par la suite, les ARNm d'histones sont uridylés en 3' par des enzymes, les TUTases (*terminal uridylyl transferases*), qui ajoutent de courtes chaînes d'uridines (3'oligo(U)) aux extrémités 3' des ARNm (Mullen and Marzluff 2008). L'inhibition de la réplication par l'hydroxyurée (HU) entraîne une disparition des messagers d'histones. De manière intéressante, la déplétion spécifique de la TUTase-4 (originellement appelée ZCCHC11) à l'aide d'un shRNA (*short hairpin RNA*) cause l'accumulation des transcrits d'histones dans des cellules où la réplication de l'ADN est inhibée par HU, ce qui suggère que l'enzyme TUTase-4 est requise chez les cellules humaines HEK293T pour la dégradation des ARNm d'histones dans le cytoplasme (Schmidt *et al.* 2011). Le rôle de la TUTase-4 est toutefois controversé. En effet, contrairement à Schmidt *et al.*, Su et collègues ont constaté de manière inattendue que la déplétion de l'enzyme TUTase-4 (*knockdown*) cause la dégradation du pool d'ARNm d'histones à la fin d'une phase S normale, mais n'a pas d'effet en présence d'hydroxyurée, suggérant qu'une autre TUTase soit nécessaire pour dégrader les ARNm d'histones en réponse aux agents génotoxiques qui interfèrent avec la réplication (Su *et al.* 2013). L'uridylation des ARNm d'histones semblerait être l'étape essentielle menant à leur dégradation (Su *et al.* 2013). Lors de l'étape suivant l'uridylation, le complexe Lsm1-7-Pat1 (*Like Sm1-7-Pat1*) lie SLBP à proximité des séquences 3'oligo(U) d'ARNm d'histones et recrute le complexe permettant de cliver la coiffe de l'extrémité 5' (5'-*cap*) de l'ARNm (Mullen and Marzluff 2008). Cette étape est importante car la perte de la coiffe permet à l'exoribonucléase Xrn1 de dégrader les ARNm d'histones dans la direction 5'→3' alors que les exonucléases de l'exosome dans le cytoplasme les dégradent dans la direction 3'→5' (Mitchell *et al.* 1997, Coller *et al.* 2001, Song and Kiledjian 2007). De plus, un fait intéressant concernant la régulation de la demi-vie

des ARNm d'histones est qu'en réponse au dommage à l'ADN en phase S, la dégradation des ARNm d'histones est dépendante d'ATR (Mec1 chez la levure), une kinase de la voie de signalisation du point de contrôle intra S (Kaygun and Marzluff 2005).

Chez la levure à bourgeonnement, le processus de dégradation des ARNm d'histones possède des différences marquées avec celui des eucaryotes supérieurs. Ceci dit, le but des mécanismes de dégradation des ARNm d'histones est le même chez la levure et l'humain : empêcher la production d'un excès d'histones. La régulation au cours du cycle cellulaire des transcrits d'histones est possible grâce à un élément situé dans la région 3'-UTR non traduite (*three prime untranslated region*) en aval de la séquence codante des ARNm (Xu *et al.* 1990, Campbell *et al.* 2002). Toutefois, contrairement à ceux des organismes métazoaires, les ARNm d'histones sont polyadénylés chez *S. cerevisiae* (Fahrner *et al.* 1980). Le mécanisme de dégradation des ARNm d'histones requière initialement leur déadénylation, c'est-à-dire le raccourcissement de la queue poly A située à l'extrémité 3' par des enzymes cytoplasmiques spécialisées du complexe de déadénylation Ccr4/Pop2/Not1 (Tucker *et al.* 2002). Les ARNm d'histones déadénylés sont sujets à la dégradation en 3'-5' par l'exosome dans le cytoplasme (Mitchell *et al.* 1997). Les ARNm déadénylés sont également la cible du complexe Dcp1/Dcp2 responsable de l'hydrolyse de la coiffe située à l'extrémité 5' des ARNm d'histones, ce qui ouvre la porte à leur dégradation par l'exonucléase Xrn1 (Larimer *et al.* 1992, Beelman *et al.* 1996). Le complexe Lsm1-7-Pat1 est conservé de la levure jusqu'à l'humain et lie de préférence les ARNm déadénylés et interagit entre autres avec Dcp1 et Xrn1 (Tharun *et al.* 2000). Chez *S. pombe*, le complexe cytoplasmique contenant Lsm1 à Lsm7 et Pat1 est essentiel à la dégradation des ARNm d'histones, puisque les transcrits d'histones sont beaucoup plus abondants dans une souche *lsm1*Δ et cette souche est sensible à l'accumulation d'histones causée par les agents génotoxiques qui réduisent la vitesse globale de synthèse

d'ADN durant la phase S (Herrero and Moreno 2011). Une réduction du dosage des gènes d'histones H3–H4 ou H2A–H2B dans la souche *lsm1Δ* réduit grandement cette sensibilité aux agents génotoxiques. Plusieurs autres facteurs jouent un rôle dans la dégradation des transcrits d'histones. En effet, la délétion de Rrp6, une exonucléase 3'–5' de l'exosome, cause une accumulation significative des ARNm d'histones et un délai dans la progression des cellules à travers la phase S est également observé par cytométrie en flux (Canavan and Bond 2007). De plus, Trf4 et Trf5, deux poly(A) polymérases, dont les fonctions sont distinctes de la principale poly(A) polymérase Pap1, seraient aussi impliquées dans la dégradation des transcrits d'histones (Reis and Campbell 2007). En effet, une souche *trf4-ts trf5Δ* à une température non permissive de 37°C tout comme la souche *rrp6Δ* accumulent les transcrits d'ARNm d'histones (Reis and Campbell 2007). Les travaux de Reis et Campbell mettent en évidence pour la première fois les ARNm d'histones comme substrats de Trf4/Trf5 (Reis and Campbell 2007). Leur rôle dans la régulation des ARN messagers des histones demeurent à être observé de plus près. Pour conclure, de multiples facteurs sont impliqués dans la régulation post-transcriptionnelle des histones via la dégradation des ARNs messagers. Cependant, il est important de noter que ces facteurs ne sont pas exclusivement spécifiques aux transcrits d'histones et que s'il existe un tel facteur, celui-ci demeure inconnu à ce jour chez la levure, tandis que chez l'humain, SLBP est spécifique aux ARNm d'histones réplication-dépendants (Townley-Tilson *et al.* 2006).

I.2.4 Régulation de la dégradation des histones

En plus de la répression transcriptionnelle et de la dégradation des ARNm, un troisième mécanisme de surveillance a été mis à jour chez la levure à bourgeonnement afin de prévenir l'accumulation et l'excès d'histones. Ce mécanisme implique la kinase Rad53 (une kinase impliquée dans la réponse au dommage à l'ADN, section I.3.1) dans la dégradation des histones libres, c'est-à-dire les histones

en excès qui ne sont pas incorporées dans la chromatine ou associées aux chaperones. À cet égard, la souche *rad53Δ sm11-1* est très sensible à la surexpression des histones (Gunjan and Verreault 2003). Il est à noter que la mutation *sm11-1* est indispensable pour supprimer la létalité causée par l'absence de Rad53 dans les cellules exprimant Sml1 (voir section I.3.), mais la mutation *sm11-1* en soit ne confère pas de sensibilité à la surexpression des histones (Gunjan and Verreault 2003). Les histones surexprimées suite à l'activation d'un promoteur GAL par induction au galactose sont dégradées de manière efficace dans une souche de type sauvage, mais cette dégradation des histones en excès est compromise dans la souche *rad53Δsm11-1*. De plus, une accumulation anormale des histones endogènes est détectable dans la souche *rad53Δsm11-1* (Gunjan and Verreault 2003). La croissance de cette souche sur galactose est aussi significativement affectée comparativement à la souche WT et cette sensibilité est exacerbée en réponse au dommage à l'ADN (Gunjan and Verreault 2003). Un fait intéressant est que le mécanisme de dégradation des histones par Rad53 ne requière pas les kinases Mec1 et Tel1 qui, en réponse au dommage à l'ADN, activent la kinase Rad53. En effet, la souche *mec1Δ tel1Δ sm11-1* n'est pas affectée par la surexpression des histones, et ce, malgré le fait que la dégradation des histones en excès soit dépendante de l'activité kinase de Rad53 (Gunjan and Verreault 2003). En outre, Gunjan et Verreault ont démontré que la délétion de la paire de gènes *hht2-hhf2* dans une souche *rad53Δsm11-1* réduit significativement les phénotypes de sensibilité au dommage à l'ADN, de perte de chromosomes et améliore la croissance cellulaire (Gunjan and Verreault 2003). Leurs résultats suggèrent aussi que Rad53 s'associe, de manière directe ou indirecte aux histones libres et que la phosphorylation des histones en excès par Rad53 est nécessaire pour leur dégradation (Gunjan and Verreault 2003). Gunjan et Verreault proposent un modèle attrayant à l'effet que Rad53 est une kinase capable de détecter spécifiquement les histones libres (histones non associées aux chaperones et non incorporées sous forme de chromatine) et que la phosphorylation des histones libres par Rad53 est un évènement clé menant à leur dégradation (Figure I.6).

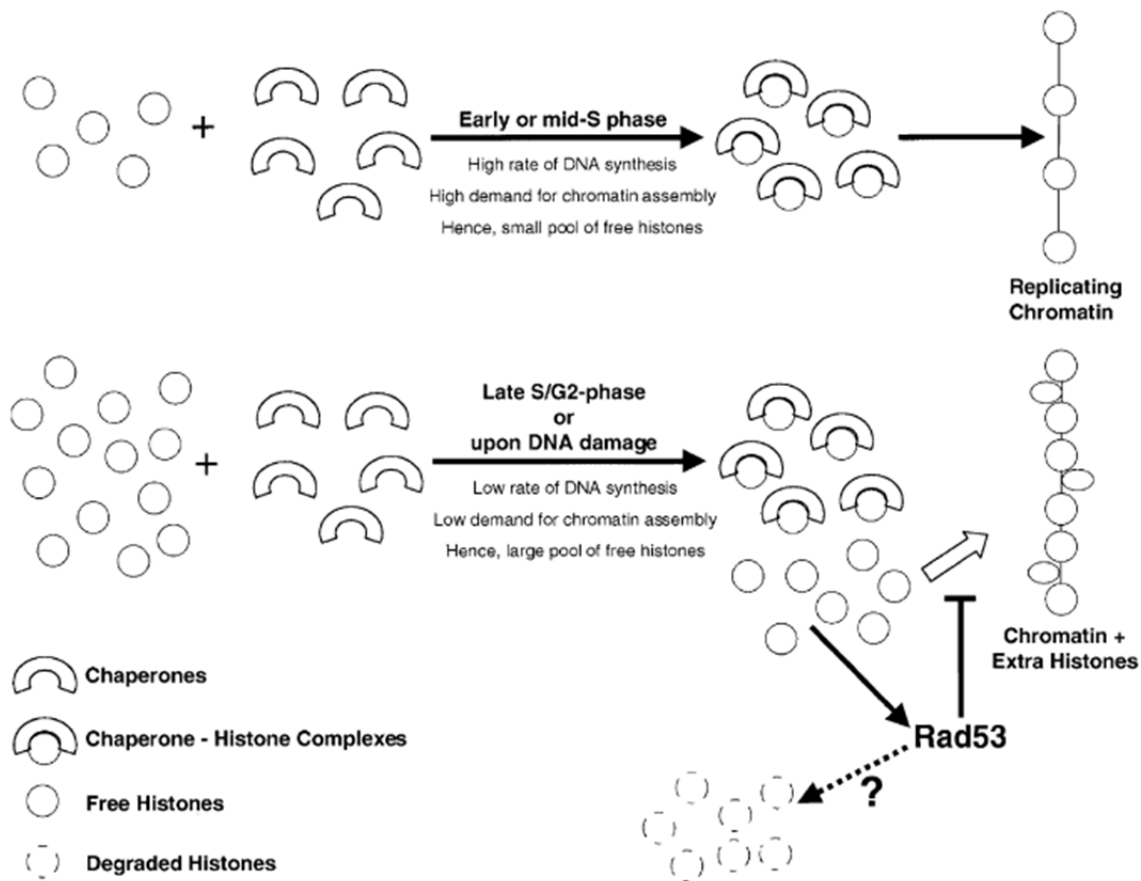


Figure I.6 Régulation du niveau d'histones par Rad53.

Pendant le début et le milieu de la phase S, la synthèse d'histones est étroitement couplée à la synthèse d'ADN afin d'éviter un excès d'histones pendant l'assemblage de la chromatine. Néanmoins, une chute drastique de la vitesse de synthèse d'ADN se produit vers la fin de la phase S et en G2 ou en réponse au dommage à l'ADN en phase S, résultant en la saturation des chaperones et l'apparition d'un excès d'histones. Rad53 détecte l'excès d'histones et les cible en vue de leur dégradation, prévenant ainsi la liaison non spécifique de ces histones libres à la chromatine, ce qui interfère avec plusieurs processus qui requièrent l'accès à l'information génétique (Gunjan and Verreault 2003). Figure tirée de: *A Rad53 Kinase-Dependent Surveillance Mechanism that Regulates Histone Protein Levels in S. cerevisiae*, Copyright 2003 par Cell. Utilisée avec la permission de l'éditeur.

I.2.5 Effets néfastes de l'excès d'histones

Tel que discuté dans les sections précédentes, la cellule a développé au moins trois mécanismes de protection pour contrer un excès d'histones (répression transcriptionnelle, dégradation des ARN messagers, et dégradation des protéines en excès) car les histones libres sont néfastes pour la cellule. En effet, les histones sont des protéines fortement basiques qui, lorsqu'elles ne sont pas liées aux chaperones ou incorporées correctement sous forme de nucléosomes, peuvent se lier de façon non spécifique à l'ADN, à l'ARN et à d'autres protéines chargées négativement (Singh *et al.* 2010). L'accumulation d'histones en phase S est liée à une chute rapide de la vitesse globale de synthèse de l'ADN, par exemple vers la fin de la phase S ou en réponse au dommage à l'ADN qui ralentit ou bloque la réplication de l'ADN et active le point de contrôle intra-S (section I.3) (Gunjan *et al.* 2006). L'excès d'histones interfère avec de multiples processus biologiques. En effet, l'accumulation d'histones libres perturbe la transcription, interfère avec les enzymes qui modifient les histones et les chaperones en les saturant, cause des anomalies chromosomiques, interfère avec la réparation de l'ADN par recombinaison homologue, provoque une incorporation inappropriée des variantes d'histones sous forme de chromatine et va même jusqu'à altérer le développement embryonnaire (Berloco *et al.* 2001, Sullivan *et al.* 2001, Henikoff and Dalal 2005, Liang *et al.* 2012). Il est évident que certaines des perturbations engendrées par un modeste excès d'histones sont à la base de dérèglements biologiques pouvant conduire à l'apparition de tumeurs. Par exemple, les défauts de réparation par recombinaison homologue de cassures spontanées à l'ADN causés par des mutations qui inactivent *BRCA2* sont à l'origine de cancers du sein (Powell and Kachnic 2003). C'est pourquoi une meilleure compréhension de ces mécanismes de surveillance est d'une importance déterminante.

I.3 Le point de contrôle intra-S

Afin d'assurer une transmission fidèle de l'information génétique aux cellules filles, les cellules en phase S doivent impérativement répliquer leur ADN tout en le

préservant de l'émergence de mutations. Lorsque la machinerie de réplication est ralentie ou bloquée par des lésions à l'ADN, une voie de signalisation appelée «point de contrôle intra-S» intervient pour prévenir toutes complications en phase S. Malgré son nom, le point de contrôle intra-S ne correspond pas à un moment précis de la phase S durant lequel la cellule s'arrête afin de corriger un défaut avant de poursuivre sa progression à travers le cycle cellulaire. En fait, la réponse cellulaire à laquelle le point de contrôle intra-S correspond peut être déclenchée à tout moment en phase S. Lors de la réplication de l'ADN, le réplisome rencontre de nombreux obstacles dont les lésions spontanées à l'ADN (Yekezare *et al.* 2013). Les lésions à l'ADN peuvent être de nature endogène ou exogène. Il est important de souligner que les lésions spontanées à l'ADN, produites par le métabolisme cellulaire, se produisent très fréquemment. Durant une phase S normale chez des cellules humaines en culture, la fréquence de cassures simple brin spontanées qui ont lieu durant chaque passage à travers la phase S est d'environ 5000 cassures qui sont produites, directement ou indirectement, par différents types de lésions comme les bases oxydées de l'ADN, les sites où une base azotée absente (AP, pour apurinique ou apyrimidique) et les produits d'alkylation (3-méthyladénine) (Vilenchik and Knudson 2003). Environ 1% des cassures simple brin d'origine endogène sont converties en cinquante cassures double brin par cellule par cycle cellulaire (Vilenchik and Knudson 2003). Il y a également les lésions causées par des composés exogènes tels les agents génotoxiques ou les inhibiteurs d'ADN polymérase. Les mécanismes d'action des agents génotoxiques qui provoquent les dommages à l'ADN utilisés dans nos travaux au chapitre II sont décrits dans la section I.3.2. La prochaine section décrit les protéines impliquées dans l'activation et la cascade de signalisation du point de contrôle intra-S. La nomenclature des protéines de la section I.3.1. fait référence aux noms des protéines de la levure *Saccharomyces cerevisiae* et le tableau comparatif I.3.1 présente les noms alternatifs des composants essentiels de cette voie de signalisation chez la levure *Schizosaccharomyces pombe* et les vertébrés.

Alternative Names for DNA Damage Response Components			
Name	<i>S. cerevisiae</i>	<i>S. pombe</i>	Vertebrates
Sensor kinases			
ATR	Mec1	Rad3	ATR
ATM	Tel1	Tel1	ATM
ATR regulatory subunit			
ATRIP	Ddc2/Lcd1	Rad26	ATRIP
Effector kinases			
Chk1	Chk1	Chk1/Rad27	Chk1
Chk2	Rad53	Cds1	Chk2
MRN complex			
Mre11	Mre11	Rad32	Mre11
Rad50	Rad50	Rad50	Rad50
Nbs1	Xrs2	Nbs1	Nbs1
9-1-1 (PCNA-like) complex			
Rad9	Ddc1	Rad9	Rad9
Hus1	Mec3	Hus1	Hus1
Rad1	Rad17	Rad1	Rad1
Rad17-RFC complex			
Rad17	Rad24	Rad17	Rad17
Rfc2-5	Rfc2-5	Rfc2-5	Rfc2-5
Adaptors and mediators			
BRCT	Rad9	Crb2/Rhp1	BRCA1 53BP1 MDC1/NFBD1
claspin	Mrc1	Mrc1	claspin

© 1999–2007 New Science Press

Table I. 1 Noms alternatifs pour les effecteurs lors du dommage à l'ADN (Morgan 2007). Figure tirée de: *The Cell Cycle* par David Morgan Copyright 2007 par *Oxford University Press*. Utilisée avec la permission de l'éditeur.

I.3.1. Cascade d'activation du point de contrôle intra-S

La cellule faisant face à des dommages à l'ADN pendant la réplication se retrouve avec des lésions de l'ADN de plusieurs types, entre autres les bases azotées endommagées (oxydées ou méthylées), cassures simple brin ou double brin. Lorsqu'il y a un dommage à l'ADN causant une cassure double brin, le complexe MRX composé des protéines Mre11, Rad50 et Xrs2 chez *S. cerevisiae*, est rapidement mobilisé au site de la lésion où il lie les deux extrémités de la cassure double brin. Le complexe MRX recrute également la kinase Tel1 via Xrs2 (Nakada *et al.* 2003). Le complexe Mec1/Ddc2 se retrouve également au bris double brin et son recrutement est dépendant des protéines RPA et Rad24 au site de la lésion (Dubrana *et al.* 2007). Tel1 et Mec1 phosphorylent l'histone H2A à la sérine 129 (souvent appelée gamma-H2A chez les levures), une modification post-traductionnelle, équivalente à celle de la variante H2A.X chez l'humain, qui a lieu sur de longs segments de chromatine de part et d'autre des cassures double brin (Shroff *et al.* 2004). L'exonucléase Exo1, avec l'aide de la protéine Sae2, initie de concert avec le complexe MRX la résection des extrémités 5'. Cette réaction génère, des deux côtés de la cassure, des extrémités 3' de l'ADN simple brin initialement reconnu par RPA (*Replication Protein A*), une protéine impliquée dans la réparation et la réplication; RPA est éventuellement remplacée par les enzymes impliquées dans la réparation des cassures double brin par recombinaison homologue (Clerici *et al.* 2005).

D'autre part, durant la réplication, une lésion dans l'un ou l'autre des brins modèles qui bloque les ADN polymérase entraîne un découplage de l'hélicase réplicative qui, malgré le blocage dans l'avancée de la polymérase, continue à séparer les brins d'ADN ce qui expose de longs segments d'ADN simple brin nu (Byun *et al.* 2005). L'ADN simple brin est rapidement recouvert par RPA qui recrute Ddc2 (Zou and Elledge 2003). Ddc2 est requise pour recruter Mec1 au site de la lésion (Paciotti *et al.* 2000, Bandhu *et al.* 2014). Il est à noter que Tel1 possède une fonction partiellement redondante avec celle de Mec1 dans l'activation du point de contrôle (Morrow *et al.* 1995). Parallèlement, le complexe Rad24-RFC (Rad24-Rfc2-Rfc3-Rfc4-Rfc5) charge

le complexe 9-1-1 au site de la lésion. Le complexe 9-1-1 (*checkpoint clamp*) de *S. cerevisiae* est constitué des protéines Ddc1, Mec3 et Rad17 qui forment un anneau autour de l'ADN endommagé. Le complexe 9-1-1 se retrouve au site de la lésion indépendamment du complexe Mec1-Ddc2, ce qui suggère que plusieurs complexes distincts se lient au site de la lésion pour promouvoir l'activation optimale du point de contrôle ainsi que pour recruter et coordonner les enzymes nécessaires à la réparation de l'ADN (Melo *et al.* 2001). Le recrutement des complexes Mec1-Ddc2 et 9-1-1 facilite la phosphorylation de Rad9 par Mec1 (Emili 1998, Vialard *et al.* 1998). La forme phosphorylée de Rad9 sert de protéine adaptatrice au site de la lésion afin de permettre à Mec1 de phosphoryler et d'activer la kinase Rad53 en aval de la cascade de signalisation (Figure I.6) (Gilbert *et al.* 2001, Sweeney *et al.* 2005).

Rad53 est une kinase centrale dans la réponse au dommage à l'ADN, car elle phosphoryle de nombreux substrats qui agissent comme effecteurs dans la cascade de la signalisation du point de contrôle intra-S. La fonction première est de préserver l'intégrité de l'ADN aux endroits où les polymérase rencontrent des lésions persistantes dans l'ADN (Lopes *et al.* 2001, Tercero and Diffley 2001, Sogo *et al.* 2002, Hu *et al.* 2012). Une seconde fonction de Rad53 dans le point de contrôle intra-S est d'inhiber l'initiation de nouvelles origines de réplication par la phosphorylation inhibitrice de Sld3 et Dbf4, deux protéines essentielles à l'initiation de la réplication qui émane de ces origines (Santocanale and Diffley 1998, Lopez-Mosqueda *et al.* 2010, Zegerman and Diffley 2010). Une origine de réplication est une séquence d'ADN où la réplication débute (Jacob and Brenner 1963). Le démarrage de la réplication à chacune des origines (*origin firing*) se fait à différents temps pendant la phase S (Raghuraman and Brewer 2010). Il existe des régions d'ADN répliquées dès le début de la phase S à partir des origines de réplication précoces et d'autres régions qui sont répliquées à partir des origines tardives (Morgan 2007, Zegerman and Diffley 2009). Ce mécanisme d'inhibition des origines tardives de réplication par Rad53 permet de diminuer la vitesse globale de synthèse d'ADN en présence de lésions. Cette fonction du point de contrôle intra S permet à la cellule de

« gagner du temps » afin de faciliter la réparation de lésions à l'ADN causées par certains agents génotoxiques ou mutagéniques (par exemple les agents alkylants) et ainsi de minimiser la fréquence à laquelle les ADN polymérase introduisent des mutations (Vazquez *et al.* 2008). Ceci dit, la diminution soudaine et globale de la synthèse d'ADN imposée par le point de contrôle intra-S a un coût, car elle entraîne l'accumulation d'un excès d'histones (Gunjan and Verreault, 2003).

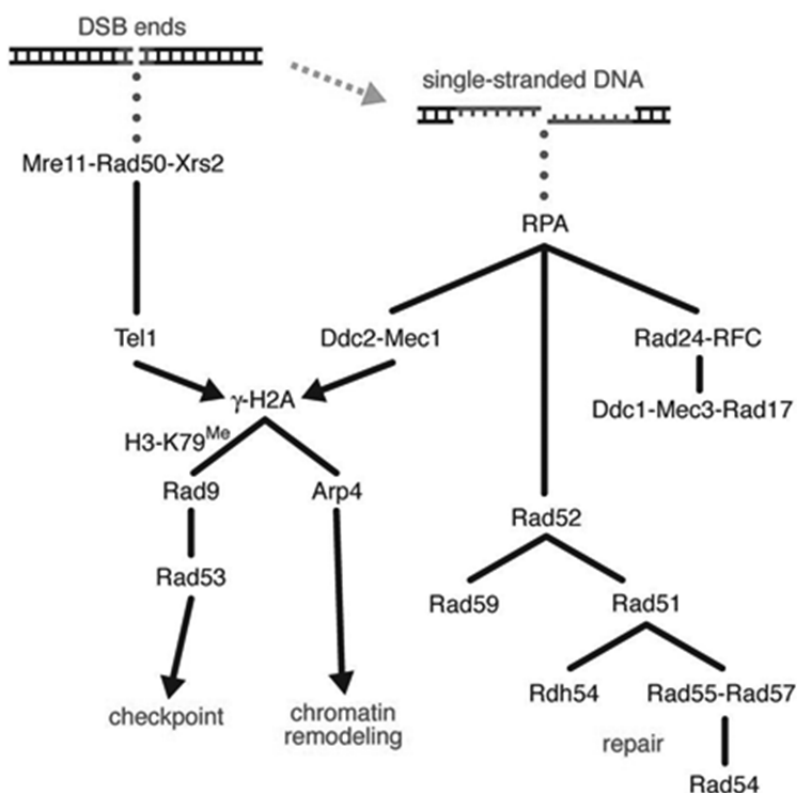


Figure I.7 Réponse aux cassures double brin chez *Saccharomyces cerevisiae*.

Les lignes noires représentent la cascade d'activation. Les lignes pointillées représentent des interactions spécifiques avec l'ADN. Les flèches indiquent les fonctions et/ou des boucles de rétrocontrôle (Lisby and Rothstein 2009). Figure tirée de: *Choreography of recombination proteins during the DNA damage response*, Copyright 2009 par *DNA repair*. Utilisée avec la permission de l'éditeur.

Rad53 joue également un rôle dans la régulation des niveaux de désoxyribonucléosides triphosphate (dNTPs) en phosphorylant Dun1 afin de l'activer. Dun1 est une protéine kinase du point de contrôle intra-S qui phosphoryle Sml1, une étape pré-requise à sa dégradation dont le rôle est d'empêcher Sml1 d'inhiber la Ribonucléotide réductase (RNR), l'enzyme qui catalyse la conversion de NTPs en dNTPs (Zhou and Elledge 1993, Zhao and Rothstein 2002, Chen *et al.* 2007). L'activité de la RNR est essentielle pour fournir les dNTPs pendant la réplication de l'ADN, mais aussi lors de dommages à l'ADN afin de réparer l'ADN endommagé par les enzymes de réparation (Chabes *et al.* 2003). Dun1 contrôle aussi d'autres mécanismes de régulation de la RNR, notamment l'import nucléaire des sous-unités de la RNR en phosphorylant et inhibant Dif1 et en inhibant également le répresseur transcriptionnel Crt1, ce qui permet d'activer les gènes impliqués dans la biosynthèse de la RNR ainsi que l'expression de gènes encodant des enzymes de réparation de l'ADN (Huang *et al.* 1998, Gasch *et al.* 2001, Lee *et al.* 2008). Par conséquent, l'activation du point de contrôle intra-S a des effets directs sur la réparation de l'ADN, la mutagenèse induite par les agents génotoxiques et la transcription en vue de mobiliser des effecteurs spécifiques pour réparer le dommage à l'ADN et atténuer l'émergence de mutations.

I.3.2 Les agents génotoxiques

Les agents génotoxiques ont différents mécanismes d'action, mais tous causent des dommages à l'ADN directement ou indirectement. Afin d'étudier le mécanisme de répression des gènes d'histones suite à l'activation du point de contrôle intra-S en réponse au dommage à l'ADN (chapitre II), nous avons utilisé deux agents génotoxiques: le méthyl méthane sulfonate (MMS) et l'hydroxyurée (HU).

I.3.2.1 Méthyl méthane sulfonate (MMS)

Les agents qui alkylent l'ADN le font sur différents atomes des purines et pyrimidines pour générer les bases N- et O-méthylées. De plus, les atomes d'oxygène des groupements phosphodiester peuvent eux aussi être méthylés, ce qui mène à leur conversion en groupements O-méthyl phosphotriester (Beranek 1990). Le MMS alkyle les adénines ou les guanines pour former la 3-méthyladénine (3-meA) ou la 7-méthylguanine (7-meG) (Wyatt and Pittman 2006). Le traitement au MMS ne cause pas d'arrêt du cycle cellulaire en G1 mais active le point de contrôle intra S, probablement parce que la 3-méthyladénine bloque la progression des ADN polymérasés (Tercero *et al.* 2003, Jena 2012).

I.3.2.2 Hydroxyurée (HU)

L'hydroxyurée est un inhibiteur de la RNR, l'enzyme qui catalyse les réactions de réduction des ribonucléotides en déoxyribonucléotides (Aye *et al.* 2014). Le pool des dNTPs disponibles devient alors limité et puisque les dNTPs servent de carburant pendant la synthèse d'ADN, le processus de réplication de l'ADN est fortement ralenti (Reichard 1988). Un point intéressant est que le HU, contrairement au MMS, ne cause pas directement de dommage aux bases azotées de l'ADN. Cependant, lorsque certaines protéines impliquées dans la réparation de l'ADN (e.g. Srs2 et la ribonucléase H2) sont absentes, les cellules deviennent très sensibles au HU, suggérant que HU cause probablement du dommage à l'ADN indirectement, mais que le mécanisme est encore méconnu (Potenski *et al.* 2014). Une chose est sûre, HU active les kinases du point de contrôle intra S, Mec1 et Rad53 qui s'assurent du maintien de l'intégrité aux fourches de réplication (Sabatinos *et al.* 2012).

I.4 Modifications de la chromatine

Le domaine globulaire et la queue N-terminale des histones, cette dernière comptant environ trente acides aminés, sont sujets à des modifications enzymatiques post-traductionnelles (PTM) covalentes réversibles résultant en une région de la chromatine devenant plus ou moins accessible à d'autres protéines effectrices. Ces protéines «lectrices» traduisent les PTMs en messages biologiques indispensables à l'exécution des processus cellulaires comme la transcription, la réparation de l'ADN ou l'assemblage des nucléosomes (Allfrey *et al.* 1964, Margueron *et al.* 2005). Il existe plus de soixante PTMs détectées initialement à l'aide du séquençage d'Edman à l'extrémité N-terminale des queues des histones ainsi que l'identification des PTMs dans le cœur des histones par la spectrométrie de masse (Edman 1949, Mersfelder and Parthun 2006). De plus, ces PTMs sont catégorisées par huit grandes classes incluant l'acétylation, la méthylation (des lysines ou arginines), la phosphorylation, l'ubiquitination, la sumoylation, l'ADP ribosylation, la désamination et l'isomérisation de la proline (Khorasanizadeh 2004, Peterson and Laniel 2004, Chakravarthy *et al.* 2005, Kouzarides 2007).

I.4.1. Acétylation des histones

L'acétylation des histones est l'une des modifications les mieux caractérisées à ce jour et fut l'une des premières PTMs découverte il y a de cela plus de quarante ans (Phillips 1963). Or, cette PTM permet la neutralisation de la charge basique de la lysine par le groupement acétyl ajouté sur sa chaîne latérale et facilite la décondensation de la chromatine. La régulation rigoureuse des PTMs est essentielle afin d'éviter la déstabilisation de la chromatine. *In vitro*, il a été démontré que l'acétylation de l'histone H4 sur la lysine 16 favorise la décondensation de la fibre de 30 nm (Shogren-Knaak *et al.* 2006). Il devient évident que l'acétylation des histones tient un rôle majeur pour le bon fonctionnement de la cellule.

I.4.2 Histone acétyltransférase

L'histone acétyltransférase (HAT) est une enzyme spécialisée dans l'ajout d'un groupe acétyl provenant du cofacteur acetyl-coenzyme A. Dans le cas d'une lysine acétylée, le groupe formé est le ϵ -N-acétyllysine situé à l'extrémité de la chaîne latérale de l'acide aminé (Marmorstein 2001). Il existe cinq super-familles de HATs (HAT1, Gcn5/PCAF, MYST, p300/CBP et Rtt109) qui sont répertoriées selon la similarité des séquences qui composent leurs domaines catalytiques (Yang 2004). Les familles HAT1, Gcn5/PCAF et MYST sont conservées de la levure à l'homme. Les familles p300/CBP et Rtt109 ne possèdent pas d'homologie de séquence, mais partagent néanmoins un certain degré d'homologie structurale de par la topologie de leur domaine catalytique. De plus, p300/CBP se retrouve exclusivement chez les métazoaires, tandis que Rtt109 n'est présent que chez les espèces fongiques. Malgré la divergence de séquences des cinq super-familles, elles partagent cependant un noyau central formé de trois feuillets bêta et d'une longue hélice alpha qui se chevauchent et qui interagissent avec l'acétyl-coenzyme A (acétyl-CoA). Chaque famille possède également d'autres segments α/β qui sont structurellement distincts et qui assurent une interaction efficace avec l'acétyl-CoA (Neuwald and Landsman 1997). Au niveau de son domaine catalytique, p300/CBP possède deux résidus thréonines nécessaires à l'acétylation du substrat alors que, chez les familles Gcn5/PCAF et MYST, ce sont deux résidus glutamates et deux résidus différents soit une cystéine et un glutamate respectivement qui sont conservés chez une même famille et qui sont essentiels dans le mécanisme d'acétylation (Yan *et al.* 2002, Berndsen *et al.* 2007). Ce mécanisme est toutefois moins connu pour les familles HAT1 et Rtt109, mais plusieurs études démontrent que HAT1 et Rtt109 requièrent la participation de protéines les aidant à lier leurs substrats. Il y a donc formation d'un complexe holoenzyme pour l'obtention d'une pleine activation de l'HAT ainsi que pour la spécificité du résidu acétylé (Han *et al.* 2007a, Liu *et al.* 2008, Kolonko *et al.* 2010). De nombreuses études structurales et fonctionnelles ont permis d'établir que l'autoacétylation des HATs est une deuxième façon d'accroître son activité enzymatique, par exemple la protéine p300/CBP qui a plusieurs lysines auto-

acétylées à des sites clés dans une boucle d'auto-activation lui permet par la suite d'être pleinement active afin d'acétyler les histones (Thompson *et al.* 2004).

Lorsque les histones sont acétylées par les HATs sur un ou plusieurs résidus simultanément, cela permet non seulement la relaxation de la chromatine dû à la modification des charges électrostatiques des queues d'histones, mais cela permet aussi aux interacteurs de la chromatine de reconnaître les histones acétylées, car ils sont dotés d'un module bromodomaine. La structure des bromodomains est conservée et consiste en l'empilement de quatre hélices regroupées (aa, aA, aB, aC), arborant une forme cylindrique, avec deux boucles inter-hélicales ZA et BC de longueurs et de séquences variables qui contiennent une poche hydrophobe constituée d'environ 100 acides aminés qui stabilise la structure et lie l'acétyllysine (Jeanmougin *et al.* 1997, Dhalluin *et al.* 1999, Sanchez and Zhou 2009). La boucle ZA possède une structure flexible et détermine la nature de l'interaction avec l'acétyllysine (Mujtaba *et al.* 2007). Les protéines qui possèdent un ou plusieurs bromodomains lient la chromatine de façon dépendante aux PTMs des histones et sont des co-activateurs, des HATs et des HDACs, ou des enzymes de modification de la chromatine tels que les remodeleurs ATP-dépendants (Mujtaba *et al.* 2007). Notamment, la sous-unité Rsc4 du complexe remodeleur RSC possède un tandem de bromodomaine (BD1 et BD2) qui lie préférentiellement H3K14Ac (Kasten *et al.* 2004). Les bromodomains sont conservés de la levure à l'homme et trois facteurs semblent dicter leur spécificité de liaison pour une acétyllysine : le premier facteur étant la structure dynamique de la boucle ZA, le deuxième étant les résidus de charge négative présents au site d'ancrage de l'histone acétylée et le troisième étant la présence de résidus aromatiques à proximité de l'acétyllysine (Zhang *et al.* 2010). En effet, des analyses structurales ont permis d'identifier que les bromodomains des HATs de mammifères PCAF et CBP reconnaissent entre autres un motif de part et d'autre de la lysine cible, ayant également chacun une séquence consensus différente (Zeng and Zhou 2002). La séquence pour PCAF contient un résidu hydrophobe (KAc+2) et un résidu chargé

positivement (KAc+3), tandis que celle pour CBP contient des résidus hydrophobes (KAc+1 et KAc+2) puis un résidu chargé positivement (KAc-1) ainsi qu'un résidu aromatique (KAc-2) (Mujtaba *et al.* 2007). En toute vraisemblance, les bromodomains reconnaissent des patrons d'acétylation, plutôt qu'un seul groupement acétyl. La compréhension des modes de reconnaissance moléculaire des bromodomains propres aux protéines qui modifient la chromatine fait partie d'un domaine émergent et de futurs travaux de biologie structurale permettront d'en apprendre davantage sur la régulation de chacun.

I.4.3 Inhibiteurs de HATs

Une activité aberrante des HATs entraîne de graves conséquences physiologiques et expose ainsi l'organisme au développement de tumeurs solides, de leucémies, d'infections virales et de translocations chromosomiques. Afin de moduler l'acétylation des histones à des fins thérapeutiques, plusieurs stratégies ont été élaborées dont l'utilisation d'inhibiteurs de HATs. Ces molécules inhibent les HATs et proviennent de sources naturelles (curcumin, garcinol), de composés chimiques qui fusionnent et miment deux substrats des HATs (Lys-CoA, H3-CoA-20) ou de dérivés synthétiques de l'acide anacardique (Furdas *et al.* 2012). Par conséquent, l'étude détaillée de la spécificité de ces inhibiteurs pour une HAT particulière, l'optimisation et la validation de ceux-ci dans un modèle animal sont requises afin de mener à d'éventuelles études cliniques chez l'humain. Heureusement, une cellule eucaryote saine s'assure d'un contrôle rigoureux du niveau d'acétylation des histones et lorsqu'il y a augmentation de l'acétylation (hyperacétylation), des enzymes appelées histone déacétylases (HDACs) retirent le groupement acétyl sur la lysine afin de réguler les niveaux d'acétylation. Ainsi, cette coordination entre l'activité des HATs et HDACs prévient l'apparition de dérèglements pouvant mener à une prolifération cellulaire excessive et même à la tumorigénèse.

I.4.4 Histone désacétylase

L'histone désacétylase est une enzyme clé dans la régulation de l'expression des gènes. Par son activation, elle promeut un état hypoacétylé de la chromatine et joue un rôle dans la répression transcriptionnelle. Chez les mammifères, il existe 18 HDACs réparties en quatre classes selon leurs caractéristiques structurales et leur homologie par rapport aux enzymes de la levure *S. cerevisiae*, à savoir les classes I, II, IV et les sirtuines (classe III) (Yang and Seto 2008). Les classes I, II et IV font parties des HDACs classiques métal-dépendantes car leur activité nécessite la présence d'un ion zinc à leur site de liaison (Tanner *et al.* 2000) alors que la classe III est nicotinamide adénine dinucléotide (NAD)-dépendante bien que le zinc soit toujours utilisé, mais il a plutôt un rôle structural (Tanner *et al.* 2000). Chez l'être humain, la classe I inclut les HDAC1, -2, -3, et -8 qui sont exprimées ubiquitairement et partage une homologie avec le régulateur Rpd3 chez la levure (Yang and Seto 2008). La classe II possède une homologie avec l'enzyme fongique Hda1 et est divisée en deux sous-classes IIa (HDAC4, -5, -7, -9) et IIb (HDAC6, -10) (Martin *et al.* 2007). Toutes classes confondues, le domaine catalytique des HDACs comprend environ 390 acides aminés conservés ainsi qu'un site actif consistant en une poche tubulaire légèrement courbée (Finnin *et al.* 1999).

Les membres de la sous-classe IIb ont pour leur part deux domaines catalytiques respectivement situés dans la région N-terminale et la région centrale de l'enzyme. En plus de son domaine s'associant au zinc, HDAC6 possède également un domaine C-terminal qui lie la dynéine (Zhang *et al.* 2006). Le retrait du groupement acétyl se produit à l'aide d'un système dit «de relais» entre les différentes charges des acides aminés du site actif de l'HDAC soit deux histidines, deux aspartates et une tyrosine (Finnin *et al.* 1999). Mis à part leur rôle primordial dans la désacétylation des histones, les HDACs agissent également sur des protéines qui ne sont pas des histones comme les protéines p53, E2F et α -tubuline. La protéine p53 étant régulée notamment par son acétylation (Sakaguchi *et al.* 1998, Abramova *et al.* 2006).

En ce qui a trait aux patrons d'expression tissulaire des différentes HDACs chez les mammifères, l'expression de HDAC6 et HDAC10 est spécifique à certains tissus tels le foie, les reins, le cerveau et les testicules (Zhang *et al.* 2008). Pour ce qui est des HDAC1, -2, -3, -5, -6, -7 et -10, les études indiquent qu'elles sont présentes dans tous les tissus de mammifères. Par contre, une augmentation marquée de l'expression des HDAC4, -8 et -9 est remarquée dans les tissus tumoraux (de Ruijter *et al.* 2003). Dans plusieurs types de cancers, on observe une activité de HDACs perturbée. Par exemple, dans le développement de la leucémie promyélocytaire aiguë, la protéine de fusion oncogénique PML-RAR α est impliquée dans le recrutement aberrant de HDACs aux promoteurs de gènes résultant en une répression constitutive de gènes importants impliqués dans la différenciation de cellules myéloïdes. On constate ainsi un blocage dans la différenciation des cellules de la lignée myéloïde qui cause une prolifération cellulaire excessive et indésirable de promyélocytes immatures (Lin *et al.* 2001). Heureusement, l'utilisation des inhibiteurs d'HDACs (HDACi) dans le traitement des leucémies est une approche prometteuse et s'est montrée efficace par le passé (Mann *et al.* 2007, Campas-Moya 2009). Ces inhibiteurs sont de plus en plus utilisés et testés autant dans des essais pré-cliniques que cliniques.

1.4.5 Inhibiteurs de HDACs

Il existe un grand nombre d'inhibiteurs d'histones désacétylases (HDACi). Les HDACi sont sous-divisés en quatre groupes. La trichostatine A (TSA) est une molécule produite par les bactéries du genre *Streptomyces*. La TSA est la plus puissante drogue quant à son effet inhibiteur et anti-prolifératif des cellules cancéreuses (Yoshida *et al.* 1990). En effet, la TSA, de par sa conformation, s'insère directement dans le site actif des HDACs et engendre ainsi le déplacement de l'ion zinc d'où l'inactivation de l'enzyme (Finnin *et al.* 1999). Malheureusement sa production est laborieuse et très coûteuse. C'est pourquoi les groupes de recherche se sont tournés vers d'autres inhibiteurs. Le deuxième groupe de HDACi est composé de molécules d'acides gras à chaînes courtes dont le butyrate, le phénylbutyrate et

l'acide valproïque. Le troisième groupe est celui des antibiotiques térapeptides cycliques et le dernier groupe contient les benzamides entre autres le CI-994 (N-acetyldinaline) et le MS-275 (Furumai *et al.* 2001). Au moins 11 HDACi font partie de plus de 80 essais cliniques en cours pour le traitement de tumeurs solides ou hématologiques mais seulement cinq molécules ont été approuvées par la *Food and Drug Administration (FDA)* aux États-Unis (Ververis *et al.* 2013). Le panobinostat (Farydak) a été récemment approuvé par la *FDA* pour le traitement des myélomes multiples (*FDA* 2015). Le vorinostat (Acide suberoylanilide hydroxamique, SAHA, Zolinza), le depsipeptide (Romidepsin, Istodax), le pralatrexate (Folotyn) et le belinostat (Beleodaq) sont utilisés dans le traitement du lymphome primitif sous-cutané à cellules T (Marks and Breslow 2007, Campas-Moya 2009, Malik *et al.* 2010, *FDA* 2014). Bien que ces molécules soient utilisées à des fins curatives dans un type particulier de cancer, l'étude de l'efficacité et de la spécificité des autres HDACi est essentielle afin de comprendre leur mécanisme d'action précis et de traiter d'autres types de cancers comme les cancers urologiques (Sharma *et al.* 2013). Il ne faut pas oublier que certains HDACi peuvent être utilisés seul ou en combinaisons avec d'autres traitements et que certains inhibiteurs peuvent avoir des effets de toxicité cellulaire résultant en des effets secondaires plus ou moins graves d'où la nécessité d'essais pré-cliniques et cliniques approfondies.

I.4.6 Acétylation de l'histone H3 sur la lysine 56 (H3K56Ac)

Tel que mentionné précédemment, la plupart des PTMs des histones se situent sur leurs queues N-terminales, mis à part l'acétylation de H3K56 dont la PTM se retrouve dans le domaine globulaire central de l'histone (Masumoto *et al.* 2005, Ozdemir *et al.* 2005, Xu *et al.* 2005). Cette modification fut découverte chez *Saccharomyces cerevisiae* et bien qu'il semble qu'elle soit conservée structurellement et fonctionnellement de la levure à l'homme, certaines études ont démontré que cela n'était pas si simple à confirmer. Les chapitres III et IV de cette thèse décrivent en détail cette controverse.

Chez la levure, l'acétylation de H3K56 en phase S est possible grâce à la HAT Rtt109 qui fonctionne de concert avec la chaperone d'histones Asf1. La désacétylation d'H3K56 se fait par les HDACs Hst3 et Hst4 durant la phase G2/M (Celic *et al.* 2006, Miller *et al.* 2006, Driscoll *et al.* 2007, Tsubota *et al.* 2007, Han *et al.* 2007b). Les histones néo-synthétisées lors de la réplication de l'ADN en phase S sont acétylées sur la lysine 56 de H3. Les nouveaux nucléosomes contenant H3K56Ac sont alors assemblés dans la chromatine par la chaperone CAF-1 (*Chromatin Assembly Factor 1*) assistée des chaperones Rtt106 (*Regulator of Ty Transposition*) et Asf1 (*Anti-silencing function 1*) (Krawitz *et al.* 2002, Groth *et al.* 2007, Fazly *et al.* 2012). H3K56Ac possède d'autres fonctions que celle de l'assemblage de la chromatine durant la réplication. En effet, cette PTM joue plusieurs rôles dans la réparation du dommage à l'ADN, dans l'assemblage de la chromatine réplication-indépendant et dans la transcription (Figure résumée I.8). Une absence ou diminution de H3K56Ac pose un sérieux problème à la cellule car plusieurs mécanismes moléculaires essentiels font défaut d'où l'importance de la compréhension au niveau moléculaire de la régulation et de la fonction de l'acétylation de H3K56. C'est pourquoi une introduction complète et détaillée de la régulation et des fonctions de H3K56Ac de la levure à l'homme se retrouve au chapitre IV (page 164) de cette thèse.

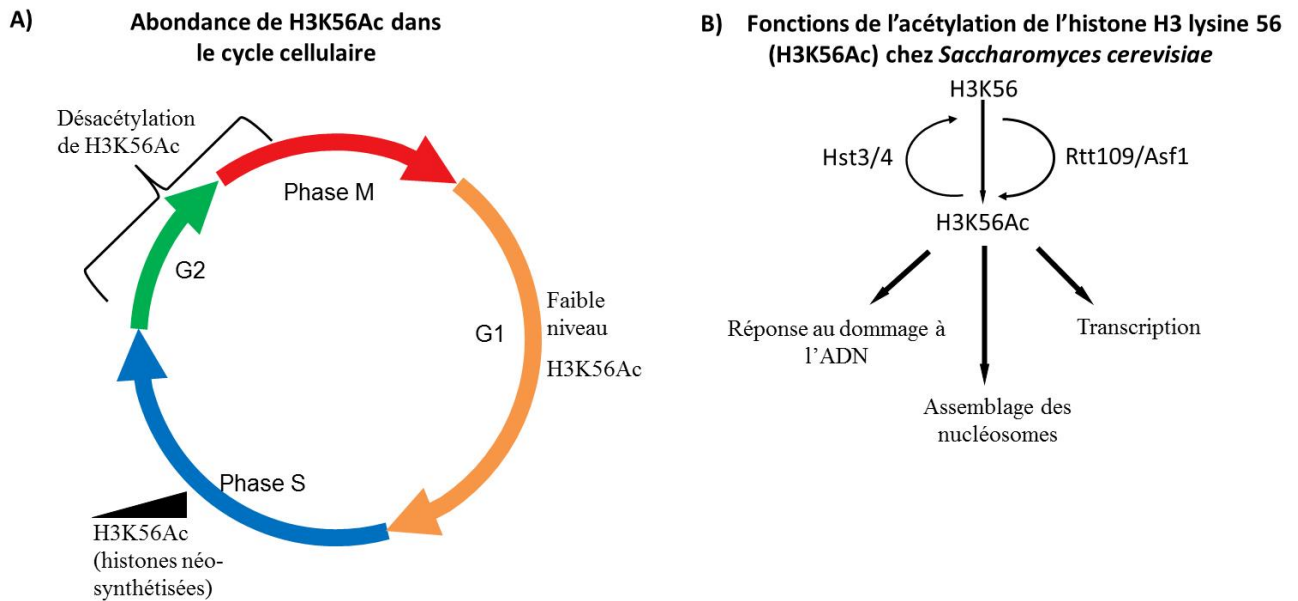


Figure I.8 Régulation et fonctions de l'acétylation de l'histone H3 lysine 56

(A,B) Chez *Saccharomyces cerevisiae*, H3K56 est principalement acétylée par l'acétyltransférase (HAT) Rtt109 à l'aide d'Asf1 sur les histones nouvellement synthétisées pendant la réplication de l'ADN en phase S (Driscoll *et al.* 2007, Tsubota *et al.* 2007, Han *et al.* 2007a, Han *et al.* 2007b). Les histones H3 acétylées à la lysine 56 sont désacétylées par les histones désacétylases (HDAC) Hst3/4 en G2/M (Maas *et al.* 2006, Thaminy *et al.* 2007). En G1, l'acétylation de H3K56 est faible (Masumoto *et al.* 2005, Rufiange *et al.* 2007). **(B)** L'acétylation de H3K56 permet l'interaction de ces histones nouvellement synthétisées avec les chaperones d'histones telles que CAF-1 et Rtt106 afin d'assurer leur déposition rapide et efficace derrière les fourches de réplication (Krawitz *et al.* 2002, Franco *et al.* 2005, Masumoto *et al.* 2005, Groth *et al.* 2007, Li *et al.* 2008, Rocha and Verreault 2008). H3K56Ac contribuerait également à la réparation de l'ADN, mais le mécanisme moléculaire n'est pas connu à ce jour (Wurtele *et al.* 2012). L'acétylation de H3K56 aurait aussi un rôle dans la transcription des gènes, plus précisément dans le désassemblage des nucléosomes (Williams *et al.* 2008).

I.4.7 Assemblage des nucléosomes lors de la réplication

La transcription des gènes d'histones a lieu majoritairement en phase S lors de la réplication de l'ADN. En effet, pendant la duplication de l'ADN, la machinerie de réplication génère deux chromatides sœurs et les histones parentales sont redistribuées à la fois sur ses deux chromatides sœurs. Ce processus s'appelle la

ségrégation des histones parentales (Krude 1999). La synthèse de nouvelles histones est donc essentielle afin de combler l'espace libre sur l'ADN afin d'y générer de nouveaux nucléosomes. Avant leur déposition dans la chromatine, les histones néo-synthétisées sont modifiées par acétylation avant d'être déposées derrière la fourche de réplication de l'ADN par des facteurs d'assemblage appelés chaperones (Verreault 2000, Krawitz *et al.* 2002, Franco *et al.* 2005, Groth *et al.* 2005, Li *et al.* 2008). Par exemple, CAF-1, Asf1 et Rtt106 ont une préférence pour les histones H3 et H4 et déposent deux dimères d'histones H3/H4 sur l'ADN qui formeront un tétramère (H3/H4)₂, un précurseur du nucléosome mature. Chez *S. cerevisiae*, les molécules d'H3 néo-synthétisées sont acétylées par Rtt109-Asf1 sur la lysine 56 avant d'être déposées sur l'ADN (Verreault *et al.* 1996, Schneider *et al.* 2006, Driscoll *et al.* 2007, Tsubota *et al.* 2007, Han *et al.* 2007b, Fillingham *et al.* 2008). D'autre part, Nap1 a été identifiée comme une chaperone qui possède une grande affinité pour les dimères d'histones H2A/H2B et qui contribue à leur déposition aux sites où les tétramères (H3/H4)₂ sont présents sur l'ADN pour compléter la formation de nucléosomes (Ishimi and Kikuchi 1991, Mosammamarast *et al.* 2002, Loyola and Almouzni 2004, Conde e Silva *et al.* 2007, Annunziato 2013). Par surcroît, des expériences d'assemblage de la chromatine *in vitro* ont montré que les remodeleurs ATP-dépendants travaillent de concert avec les chaperones afin d'établir l'espacement correct entre les nucléosomes (Ito *et al.* 1999, Tyler 2002).

I.5 Objectifs de la thèse

Durant mon doctorat, mes recherches se sont concentrées sur la compréhension du mécanisme de répression transcriptionnelle des gènes d'histones par le complexe HIR en réponse au dommage à l'ADN chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*. J'ai aussi contribué à un second projet portant sur les modifications post-traductionnelles des histones induites par les inhibiteurs d'histones désacétylases dans les cellules humaines.

Le chapitre II de cette thèse présente mes travaux sur l'étude du mécanisme de répression transcriptionnelle des gènes d'histones en réponse au dommage à l'ADN. Tel que discuté dans la section précédente, l'excès d'histones est nocif pour la cellule, d'où mon intérêt d'étudier les mécanismes de surveillance qui permettent à la cellule d'empêcher l'émergence d'un excès d'histones. Mon objectif principal de recherche était de caractériser de nouvelles fonctions des kinases du point de contrôle intra-S dans la régulation du complexe HIR en réponse au dommage à l'ADN. Ce mécanisme était très mal connu et mes résultats ont permis de démontrer que les kinases du point de contrôle, particulièrement la kinase Rad53 régule le complexe HIR en phosphorylant la sous-unité Hpc2 du complexe HIR et que cette phosphorylation est nécessaire pour le recrutement du complexe remodelleur RSC aux promoteurs des gènes d'histones. De plus, mes expériences sur la stabilité d'Hpc2 ont permis de démontrer que la protéine redevient stable en milieu d'une phase S normale, ce qui suggère étonnamment que le complexe HIR réprime les gènes d'histones pendant la réplication de l'ADN, et ce, même en absence de dommage à l'ADN.

Dans un deuxième temps, j'ai focalisé mon attention sur les modifications post-traductionnelles des histones de différentes lignées cellulaires cancéreuses et normales afin de démystifier l'impact des inhibiteurs de désacétylases (HDACi) sur leur patron global d'acétylation (chapitre III). Nous avons remarqué avec grande surprise que les histones H2A et H2B semblaient peu affectées par les HDACi contrairement aux histones H3 et H4. Par ailleurs, nous avons fait une autre découverte surprenante à l'effet que l'acétylation de l'histone H3K56 chez l'humain était beaucoup moins abondante que les données publiées dans la littérature. Certains groupes de recherche déclaraient que l'acétylation d'H3K56 pourrait être considérée comme un biomarqueur de cancer. Cela m'a mené à investiguer plus en profondeur la spécificité des anticorps utilisés dans ces expériences et mes résultats mettent en lumière le manque de spécificité des anticorps contre l'acétylation d'H3K56 et leur inutilité pour le diagnostic du cancer (chapitres III et IV).

Chapitre II

Checkpoint Kinase Mediated Repression of Histone Genes Upon Genotoxic Stress

Chapitre II. Checkpoint Kinase Mediated Repression of Histone Genes Upon Genotoxic Stress

Valérie Villeneuve*, Ugander Reddy Gajjalaiahvari*, Marie-Helene Miquel
Kabbaj, Marlene Gharib, Pierre Thibault, Alain Verreault, Akash Gunjan, and
Johanna Paik[#]

*** These authors contributed equally to this work.**

Corresponding author:

Johanna Paik

Running title: Regulation of histone gene expression upon genotoxic stress.

This chapter corresponds to a manuscript that will be re-submitted to PLoS Biology

I.1 Abstract

In eukaryotic cells, DNA damage during S-phase leads to a rapid decrease in the rates of DNA synthesis that is accompanied by a dramatic reduction in histone mRNA levels. This response helps balance the rates of histone and DNA synthesis but the underlying molecular mechanisms are poorly understood. Here we show that the protein kinases involved in the DNA damage response in *S. cerevisiae*, namely Rad53 and its upstream activators Mec1/Tel1, are necessary to trigger transcriptional repression of the four core histone genes when S-phase cells are treated with genotoxic agents that inhibit DNA replication. We demonstrate that the checkpoint kinases mediate the repression of core histone genes by phosphorylating the Hpc2 subunit of the HIR complex and recruiting the RSC chromatin remodeler. Hpc2 stabilization is Mec1/Tel1- and/or Rad53 dependent. Furthermore, we identified a novel mechanism involving Hpc2 stability at the G1/S transition and in a normal S-phase. Our results provide a molecular foundation to understand this novel role for checkpoint kinases in preventing the accumulation of excess histones and we obtained valuable insights into how the HIR complex is regulated at the G1/S transition, prior DNA replication.

II.2 Introduction

The bulk of histone synthesis in proliferating cells is restricted to S-phase of the cell cycle (Osley 1991). During S-phase, newly synthesized histone H3/H4 form complexes with a series of proteins, such as Asf1 and CAF-1, that promote their deposition behind the replication fork almost as soon as enough DNA has emerged from the replisome (Sogo *et al.* 1986). Coordination of histone and DNA synthesis is important to allow both rapid nucleosome formation behind the replication fork and to prevent the accumulation of excess histones. Because of their highly basic nature, excess histones bind non-specifically to chromatin, leading to mitotic chromosome segregation defects (Meeks-Wagner and Hartwell 1986) and sensitivity to a variety of DNA damaging agents (Gunjan and Verreault 2003, Reis and Campbell 2007, Herrero and Moreno 2011). In addition, inappropriate expression of histone mRNAs results in abnormal oogenesis and an early embryonic developmental arrest in *Drosophila* (Berloco *et al.* 2001, Sullivan *et al.* 2001). Consistent with this, specialized mechanisms exist to inhibit excessive translation of the large reservoir of histone RNAs present in unfertilized *Xenopus* oocytes (Sánchez and Marzluff 2004).

Cells have evolved at least three partially redundant strategies to prevent the harmful effects of excess histones. First, yeast cells monitor the presence of excess histones that are not incorporated into chromatin and trigger their degradation (Gunjan and Verreault 2003, Kumar Singh *et al.* 2007). Second, DNA damaging agents that interfere with replication elicit an evolutionarily conserved response that leads to the disappearance of histone mRNAs (Reis and Campbell 2007, Herrero and Moreno 2011, Su *et al.* 2013). Both yeast and human cells have mechanisms that block histone gene transcription in response to agents that impede replication (Osley and Lycan 1987, Xu *et al.* 1992, Sherwood *et al.* 1993,

Kaygun and Marzluff 2005). In human cells, replication-dependent histone mRNAs end in a stemloop structure and interference with DNA replication triggers their degradation (Kaygun and Marzluff 2005). A dedicated exonuclease that recognizes the histone mRNA stemloop has been identified and is likely involved in histone RNA degradation *in vivo* (Dominski *et al.* 2003, Yang *et al.* 2006). In *Saccharomyces cerevisiae*, histone mRNAs are polyadenylated and, although their stability increases during S-phase (Lycan *et al.* 1987), their half-life remains relatively short even during normal S-phase progression (Herrick *et al.* 1990). In spite of this, a post-transcriptional mechanism that senses the presence of excess histone RNAs and triggers their degradation exists in both budding and fission yeast (Reis and Campbell 2007, Herrero and Moreno 2011). In yeast, chemicals that interfere with DNA replication also trigger a concerted transcriptional repression of the four gene pairs encoding core histones (Osley 1991). Three of the four divergent histone gene promoters contain a repressive cis-acting element (*NEG*) that is required for histone gene repression outside of S-phase and in response to drugs that interfere with replication (Figure II.1A). Four functionally related histone gene regulatory proteins (Hir1, Hir2, Hir3 and Hpc2) form the HIR protein complex that act to promote histone gene repression through the *NEG* element (Osley 1991, Sutton *et al.* 2001). In addition, the four Hir proteins and Asf1 form a complex that mediates replication-independent deposition of histones H3/H4 onto DNA (Green *et al.* 2005, Prochasson *et al.* 2005, Tang *et al.* 2006). The role of Hir proteins in histone gene repression is conserved in fission yeast (Blackwell *et al.* 2004). Interestingly, a human homologue of *S. cerevisiae* Hir1 and Hir2, known as HIRA, is also capable of triggering repression of replication-dependent histone genes when overexpressed (Nelson *et al.* 2002).

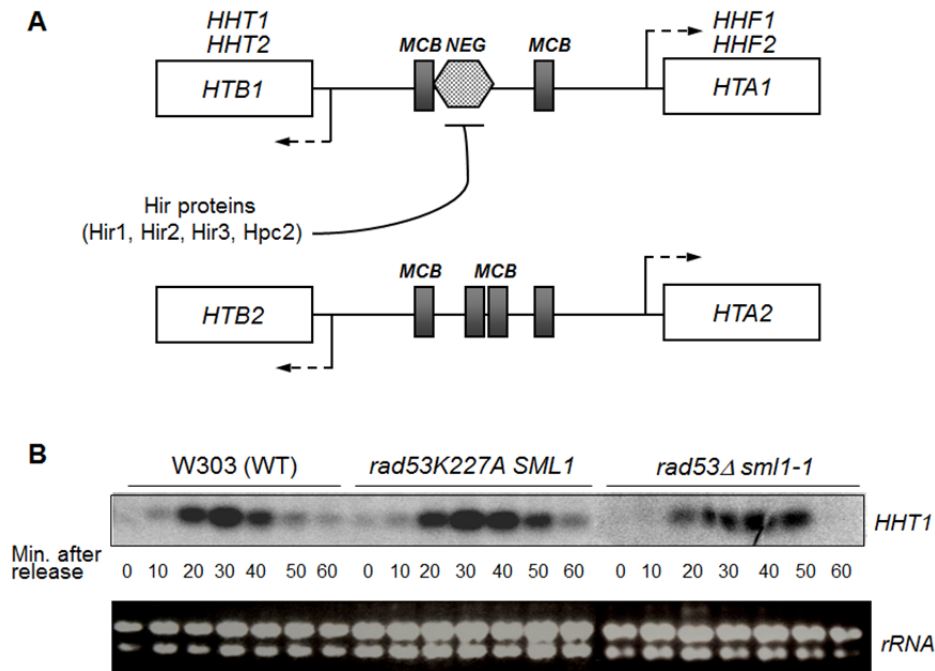


Figure II.1 Rad53 is not required for cell cycle regulation of histone gene transcription.

(A) Histone genes are organised as four gene pairs encoding either H3-H4 (HHT1-HHF1 and HHT2-HHF2) or H2A-H2B (HTA1-HTB1 and HTA2-HTB2). Each gene pair is transcribed from a divergent promoter. Three of the four core histone gene promoters are repressed by Hir/Hpc proteins through a negative cis-acting element (*NEG*). The HTA2-HTB2 promoter lacks the *NEG* element and is not subject to Hir/Hpc-mediated repression. (B) Wild type (W303) and *rad53* mutant cells were synchronized with α -factor in G1 and released into the cell cycle in prewarmed rich medium. Cells were harvested every 10 minutes after release. Total RNA was isolated and analyzed by northern blotting to detect HHT1 mRNAs. Ethidium bromide stained 26S and 18S rRNA levels are shown as loading control.

Many cancer chemotherapeutic agents exert their cytotoxic effects by interfering with the passage of DNA replication forks. This is the case for the alkylating agent methyl methane sulfonate (MMS). Although MMS lesions can activate the DNA damage response outside of S-phase (Sidorova and Breeden 1997), low doses of MMS only trigger checkpoint activation during S-phase when replication

fork progression is impeded by the presence of lesions in the DNA template (Tercero *et al.* 2003). Stalled replication forks elicit a multi-faceted and evolutionarily conserved response known as the intra S-phase DNA damage checkpoint (Longhese *et al.* 2003). In *S. cerevisiae*, several features of this response rely on the activation of three protein kinases. In concert with a number of other checkpoint proteins (Longhese *et al.* 2003), the upstream kinases Mec1 and Tel1 function to activate the forkhead-associated (FHA) domain protein kinase Rad53 (Sanchez *et al.* 1996, Sweeney *et al.* 2005). In response to DNA damage during S-phase, Mec1 and Rad53 prevent irreversible collapse of stalled replication forks and the formation of abnormal DNA structures (Sogo *et al.* 1986, Lopes *et al.* 2001, Tercero and Diffley 2001). In addition, Mec1 and Rad53 also block the firing of new replication origins (Santocanale and Diffley 1998, Shirahige *et al.* 1998). This DNA damage-induced block in origin firing introduces a significant delay in S-phase progression (Paulovich and Hartwell 1995), which in turn leads to an accumulation of newly synthesized histones (Gunjan and Verreault 2003).

A number of studies revealed that DNA damaging agents trigger changes in the expression of a large number of genes (Aboussekhra *et al.* 1996, Jelinsky *et al.* 2000, De Sanctis *et al.* 2001, Gasch *et al.* 2001). In some cases, these changes in gene expression are clearly not a mere consequence of the cell cycle arrest imposed by checkpoint activation. For instance, *RNR* genes that encode subunits of ribonucleotide reductase, the enzyme that catalyzes the rate-limiting step in deoxyribonucleoside triphosphate (dNTP) synthesis, are induced following DNA damage (Huang *et al.* 1998). Induction of *RNR* genes in response to DNA damage likely serves as a source of additional dNTPs to promote DNA repair (Huang *et al.* 1998). In addition to its role outside of S-phase, this response may be important even when damage occurs during S-phase to promote the action of specialized polymerases involved in DNA lesion bypass (Chabes *et al.* 2003).

Mec1, Rad53 and a third protein kinase, known as Dun1, contribute to ribonucleotide reductase (Rnr) activation by promoting the degradation of Sml1, a stoichiometric inhibitor of Rnr1, during each passage through S-phase (Zhao and Rothstein 2002, Chen *et al.* 2007). This housekeeping function of Mec1, Rad53 and Dun1 in Sml1 degradation is indispensable for chromosomal DNA replication in *S. cerevisiae* (Zhao *et al.* 2001). Little attention has been paid to the roles of checkpoint kinases in DNA damage-dependent transcriptional repression. However, following DNA damage in G1, a role for Rad53 in the repression of cyclin genes has been uncovered (Sidorova and Breeden 1997, Sidorova and Breeden 2003).

In this study, we explored the potential roles of DNA damage checkpoint kinases in the repression of histone mRNAs caused by genotoxic agents that slow down replication. We show that Rad53 and its upstream kinases Mec1/Tel1 are necessary for histone gene repression in response to genotoxic agents that interfere with DNA replication. DNA damage-induced histone gene repression requires the phosphorylation of the Hpc2 subunit of the Hir complex and the recruitment of the RSC chromatin remodeling complex to histone gene promoters, which is abolished in *rad53* mutants as well as in *hpc2* phosphorylation site mutants. Our data therefore reveal a novel role for the checkpoint kinases Mec1/Tel1 and Rad53 in preventing inappropriate accumulation of histone mRNAs in response to genotoxic agents that inhibit DNA replication.

II.3 Experimental procedures

Yeast methods

All the yeast strains used in this study are congenic to W303-1a and are listed in Supplemental Table II.1 provided in the supplemental material section of the manuscript. Yeast cells were routinely grown at 30°C in either rich (YPD) or synthetic minimal medium lacking tryptophan to select for the pTS39b plasmid. For experiments involving the temperature sensitive (ts) strain *cdc7-4*, cells were cultivated at 24°C and blocked at G1/S transition by switching the temperature at 38°C. For experiments involving synchronized yeast cultures, cells were grown to a density of 1×10^7 cells/ml and α -factor was added at a concentration of 20 μ g/ml for 2 hrs or until the cells were arrested in G1 phase of the cell cycle. The α -factor was removed by washing the cells with prewarmed medium after which the cells were resuspended in prewarmed medium to allow progression into S-phase. Hydroxyurea (0.2M) or methyl methane sulfonate (0.1%) were added 20 min following α -factor release, which corresponds to early S-phase as judged by FACS analysis. Cell aliquots (10ml) were harvested at 10-min intervals by the addition of sodium azide to 0.1% and centrifugation. The resulting cell pellets were frozen on dry ice and stored at -80°C for subsequent isolation of RNA. For experiments involving exponentially growing yeast cultures, cells were grown to a density of 1×10^7 cells/ml before being treated with or without HU for varying lengths of time, following which they were processed exactly as described above for synchronized cultures.

RNA isolation and northern blot analysis

Total yeast RNA was isolated from 10 ml of cells at a density of $1-2 \times 10^7$ cells/ml. RNA was extracted using the RNeasy Kit (Qiagen) according to manufacturer's instructions. Total RNA (20 μ g/lane) was resolved in a 1% agarose-formaldehyde gel (Sambrook *et al.* 1989). The gel was transferred overnight onto a Hybond-XL nylon

membrane (Amersham Pharmacia) by upward capillary transfer in 20×SSC (1×SSC is 0.15M NaCl, 15mM sodium citrate). RNA was fixed to the membrane by cross-linking with 0.12J of UV irradiation using a UV Crosslinker (UVP). Membranes were pre-hybridized for 1 hr at 68°C in ExpressHyb solution (Clontech). Hybridization was performed in the same buffer at 68°C for 1-2 hr with [γ -³²P] UTP labeled antisense RNA probes transcribed *in vitro* using the MAXIscript kit (Ambion) following the manufacturer's instructions. The DNA fragments used to generate the probes were derived from the 3'-untranslated region of histone genes to enable specific detection of transcripts derived from each gene. Subsequently, the membrane was washed three times with 2×SSC, 0.05% SDS at room temperature, followed by three washes in 0.1×SSC, 0.1% SDS at 50°C. Northern blots were quantitated on a phosphorimager (Molecular Dynamics).

Flow cytometry (FACS) analysis

Samples (1ml) of cultures at a density of 1-2 x 10⁷ cells/ml were harvested by centrifugation and fixed for 1 hr by resuspending the cells in 1ml of 70% ethanol. Samples were processed for FACS analysis by washing once with 1ml of 50mM Tris-HCl pH 7.8. The cells were resuspended in 500µl of the same buffer containing 10µl of 10mg/ml Ribonuclease A and incubated for 5-6 hours at 37°C. The cells were pelleted and resuspended in 500µl FACS buffer (200mM Tris-HCl pH7.5, 200mM NaCl, 78mM MgCl₂) containing 15µl 2mg/ml propidium iodide or Sytox Green. Cell aliquots (100µl) were diluted in 1ml of 50mM Tris-HCl pH7.8, sonicated and analyzed by flow cytometry (FACScan, Becton-Dickinson or BD Biosciences FACS Canto II flow cytometer).

Chromatin immunoprecipitation (ChIP)

Detailed procedures are described in the Supplemental section II.7.

***In vitro* purification and kinase assays of Rad53 and Hpc2**

Detailed procedures are described in the Supplemental section II.7.

Immunoprecipitation

For immunoprecipitation of tagged proteins, cells were harvested from 1 liter cultures at $\sim 2 \times 10^7$ cells/ml. Whole-cell extracts (WCEs) were prepared by grinding cells in liquid nitrogen in a SPEX CertiPrep 6850 Freezer Mill in 20 ml lysis buffer containing protease and phosphatase inhibitors (20mM Hepes-KOH pH 7.5, 110mM potassium acetate, 10% glycerol, 0.1% Tween-20, 1 mM sodium vanadate, 50 mM sodium fluoride, 50 mM sodium β -glycerophosphate, 10 mM sodium butyrate, 10 mM 2-mercaptoethanol, 1X Roche protease inhibitor cocktail, 5 μ M MG-132). Extracts from equal amounts of cells were incubated overnight at 4°C with Flag M2 (Sigma), 9E10 or IgG sepharose (Amersham Biosciences) beads to immunoprecipitate Flag, Myc and TAP-tagged proteins respectively. The immunoprecipitated material was resolved on 4-12% Bis-Tris Criterion™ XT Pre-cast polyacrylamide gels run in XT MES buffer (Bio-Rad) and probed for the presence of Flag, Myc or TAP tagged proteins by Western blotting using appropriate antibodies.

Western Blotting

For the detection of Rad53 or Hpc2 by Western blotting, 1.5×10^7 to 3.0×10^7 cells were harvested and frozen immediately in liquid nitrogen. Whole-cell extracts were prepared using an alkaline method (Kushnirov 2000). The extracts were analyzed in respectively SDS-7.8% or 10% polyacrylamide gels optimized for separation of phosphorylated Rad53 or Hpc2. Rad53 polyclonal antibodies were a generous gift from Dr. John Diffley (Cancer Research UK) and were used at a 1:2000 dilution. Western blotting for the detection of immunoprecipitated Flag, HA, Myc or TAP tagged proteins was carried out using Flag M2 antibodies (Sigma), HA 12ca5 (from Dr. Alain Verreault), 4A6 Myc antibodies (Upstate) and peroxidase anti-peroxidase (PAP) complex (Sigma) respectively at 1:2000 dilution. H3-C antibodies (Gunjan and Verreault, 2003) were used at $0.3 \mu\text{g/ml}$ for the detection of H3 by Western blotting

II.4 Results

Cell cycle regulation of histone mRNAs is not affected in *rad53* mutants

We recently showed that Rad53 is involved in degradation of excess histones that are not packaged into chromatin (Gunjan and Verreault 2003). This housekeeping function of Rad53 is important for normal cell cycle progression and the fidelity of mitotic chromosome segregation. Yeast cells lacking Rad53 accumulate abnormally high amounts of newly synthesized histones bound to three distinct chaperones: Asf1, CAF-1 and Hir proteins (Emili *et al.* 2001, Gunjan and Verreault 2003). In wild type cells, histone gene transcription is normally restricted to a brief period from late G1 to mid S-phase (Hereford *et al.* 1982). It was formally possible that part of the accumulation of newly synthesized histones in *rad53* mutant cells arose as a result of a defect in cell cycle regulation of histone gene transcription. In order to address the contribution of Rad53 to cell cycle regulation of histone mRNAs, we synchronized wild type and *rad53* mutant cells in G1 phase of the cell cycle using α -factor. The cells were released into S-phase in rich medium at 30°C and 10-min time points were collected to analyze histone mRNA expression using northern blots. FACS analysis in both wild type and *rad53* mutant cells revealed that S-phase was completed about 30 min after release from α -factor (data not shown). The kinetics of histone mRNA accumulation and disappearance during normal passage through S-phase were very similar in wild type and *rad53* mutant cells (Figure II.1B). However, we consistently observed a delay in histone mRNA disappearance at the end of S-phase in *rad53* mutant cells (Figure II.1B, 50 min), which may reflect the slightly longer duration of S-phase that has been reported in *rad53* mutants (Cha and Kleckner 2002). This delay was not merely a reflection of slower replication due to limiting dNTP pools because it was observed in *rad53 Δ sm11-1* cells, which carry a null mutation of the Rnr inhibitor Sm11. In spite of this, histone mRNAs returned to very low levels in G2/M cells (Figure II.1B). Thus, *rad53* mutant cells were not defective in the cell cycle regulation of histone gene transcription.

The kinase activity of Rad53 is required for histone gene repression triggered by genotoxic agents that impede replication.

Drugs that interfere with replication such as MMS and HU result in an accumulation of newly synthesized histones that is more pronounced in *rad53* mutants than in wild type cells (Gunjan and Verreault 2003). The fact that inhibitors of DNA replication elicit the disappearance of histone mRNAs in both yeast and higher eukaryotes (Osley 1991) prompted us to determine the role of Rad53 in this response. In order to address whether histone transcripts were downregulated by agents that impede replication, cells were synchronized with α -factor and released for 20 minutes to allow the cells to reach the beginning of S-phase before treating them with HU or MMS. In wild type cells, histone *HHT1* or *HHF1* mRNAs declined within 10 minutes following the addition of HU (Figure II.2). This is roughly the time required for HU to halt DNA synthesis as judged by FACS (Figure II.2B, 20- and 30-min time points). Unlike wild type cells, *rad53* Δ *sml1-1* mutants were clearly deficient in down-regulating histone mRNAs in response to HU treatment during S-phase (Figure II.2A). This defect was not due the *sml1-1* mutation because *sml1-1* mutant cells were capable of triggering disappearance of histone mRNAs in response to HU or MMS (data not shown). In addition, *rad53K227A* mutant cells, which carry a point mutation in the kinase domain of *RAD53* and a wild-type *SML1* gene (Pelliccioli *et al.* 1999), were incapable of down-regulating histone mRNAs in response to agents that slow down replication (Figure II.2A). Thus, the kinase activity of Rad53 was necessary to prevent histone mRNA expression under conditions that block replication.

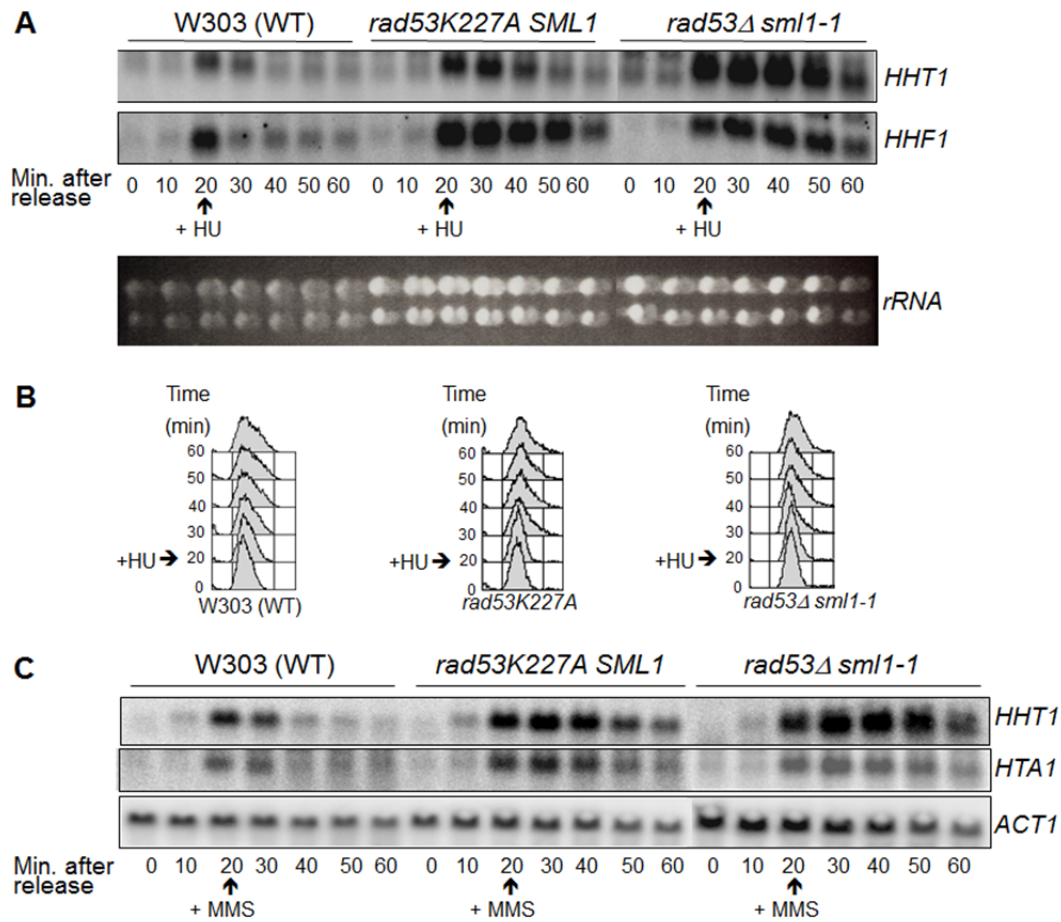


Figure II.2 Downregulation of histone mRNAs in response to hydroxyurea (HU) and Methyl Methane Sulfonate (MMS) is impaired in *rad53* mutant cells.

(A) Wild type (W303) and *rad53* mutant cells were released from α -factor arrest and 0.2M HU was added at the beginning of S-phase (20min) to slow down DNA replication by depleting dNTPs. Northern blots were performed to monitor the HHT1 and HHF1 transcripts. Ethidium bromide stained 26S and 18S rRNA levels are shown as loading control. The delay in DNA replication caused by HU was monitored by FACS. (B) Flow cytometric analysis of the DNA content of the cells used in the experiment shown in (A). (C) Wild type (W303) and *rad53* mutant cells were released from α -factor arrest and 0.1% MMS was added at the beginning of S-phase (20min) to interfere with DNA replication. Northern blots were performed to detect the HTA1 or the ACT1 transcripts as loading control.

The disappearance of histone mRNAs also occurred when wild type cells were treated with the alkylating agent MMS at the beginning of S-phase and the kinase activity of Rad53 was required for this response (Figure II.2C). The checkpoint kinases Mec1 and Rad53 are both required to block the firing of late origins in response to low doses of MMS damage during S-phase (Santocanale and Diffley 1998, Shirahige *et al.* 1998). However, we used a dose of MMS (0.1%) that causes a large number of DNA lesions that physically hinder replication fork elongation irrespective of the presence or absence of Rad53 and Mec1 (Tercero *et al.* 2003). Thus, the failure to repress histone mRNAs in *rad53* mutants treated with MMS was not merely due to the lack of intra S-phase checkpoint and continuation of replication in the presence of DNA damage. Consistent with this, HU blocked replication in both wild type and *rad53* cells, but only *rad53* mutant cells retained high levels of histone RNAs in the presence of HU (Figure II.2A). All three histone gene pairs that are regulated by Hir/Hpc proteins through the *NEG* promoter element (*HHT1-HHF1*, *HHT2-HHF2* and *HTA1-HTB1*) were repressed in a Rad53-dependent manner in response to genotoxic agents that interfere with DNA replication (Figure II.2, II.3A and data not shown). In contrast to these loci, *HTA2-HTB2* lacks the *NEG* promoter element (Figure II.1A) and, unlike *HTA1-HTB1*, its expression is not downregulated as a function of increased histone gene copy number (Moran *et al.* 1990). This is interesting because the repression of *HTA2-HTB2* in response to HU treatment is not affected by mutations in either Hir proteins (Osley and Lycan 1987, Xu *et al.* 1992) or Asf1 (Sutton *et al.* 2001), a histone chaperone that binds to Rad53. We therefore investigated whether the expression of mRNAs derived from the *HTA2-HTB2* locus was also regulated by Rad53. As observed for RNAs from the other three histone loci, we found that the kinase activity of Rad53 was also required for downregulation of *HTB2* mRNAs upon MMS-induced DNA damage (data not shown). This result does not rule out the possibility that Asf1 and Hir/Hpc proteins may be targets of Rad53 to repress the three other histone gene loci. However, given that the *HTB2* promoter lacks the *NEG* element needed for HIR-mediated repression, the fact that

HTB2 RNAs are repressed by MMS implies that repression of the *HTA2-HTB2*, promoter requires the phosphorylation of a target of Rad53 other than Hpc2.

Rad53 triggers histone gene promoter repression in response to DNA lesions that impede replication

S. cerevisiae cells have a post-transcriptional mechanism that enhances the stability of histone mRNAs during S-phase to meet the demand for rapid nucleosome assembly at the replication fork (Lycan *et al.* 1987, Xu *et al.* 1990). However, in spite of this mechanism, histone RNAs have a relatively short half-life (<5 min) during S-phase (Herrick *et al.* 1990). In principle, Rad53 could act both by destabilizing histone RNAs and triggering histone gene repression. However, it was unlikely that the pronounced reduction of histone RNAs induced by agents that interfere with replication could occur without promoter repression. We therefore sought to demonstrate that Rad53 did repress histone gene promoters using a construct in which a neomycin resistance reporter gene was under the control of the *HTA1* promoter (Xu *et al.* 1992). Unlike natural histone RNAs, the mRNAs from this reporter gene lacks the 3'-untranslated region necessary for post-transcriptional stabilization during S-phase (Xu *et al.* 1990, Xu *et al.* 1992). Wild type and *rad53* null mutant cells carrying the *HTA1-neo* reporter gene were released from a G1 arrest and genotoxic agents were added at the beginning of S-phase (20-min time points in Figure II.S1.). The neomycin transcripts disappeared from wild type cells upon addition of either HU or MMS (Figure II.S1.). In striking contrast, the neomycin transcripts kept accumulating when *rad53* mutant cells were treated with HU or MMS at the beginning of S-phase (Figure II.S1.). This result demonstrates that Rad53 triggers histone gene promoter repression in response to genotoxic agents that interfere with replication.

Passage through S-phase in the absence of histone gene transcription results in rapid cell lethality (Kim *et al.* 1988). Therefore, the potential of Rad53 to repress histone gene transcription needs to be carefully controlled to avoid inappropriate repression of histone genes during normal replication. For this reason, we explored the roles of the upstream checkpoint kinases Mec1/Tel1 in the repression of histone gene expression induced by DNA damage. In response to DNA damage during S-phase, Rad53 is directly phosphorylated in a Mec1/Tel1-dependent manner, which leads to a substantial increase in both auto-phosphorylation of Rad53 and its kinase activity (Gilbert *et al.* 2001, Sweeney *et al.* 2005). Although the repression of histone gene promoters following HU treatment was unaffected in either *mec1Δ* or *tel1Δ* single mutants, a *mec1Δ tel1Δ* double mutant strain was defective in this response (Figure II.3A). We further confirmed this result by treating wild type cells with caffeine, an inhibitor of PI3-kinases such as Mec1 and Tel1 (Vaze *et al.* 2002). Caffeine inhibited the downregulation of histone genes triggered by HU in wild type cells (Figure II.3B). Further, repression of histone genes in HU requires continuous kinase activity of Mec1/Tel1, as addition of caffeine in the presence of HU resulted in the inappropriate re-activation of histone genes in the absence of normal replication (Figure II.3C). This inhibitory effect of caffeine on the HU-induced repression of histone genes in wild type cells in response to HU was directly correlated to the rapid dephosphorylation of Rad53 upon caffeine treatment (Figure II.3C). This is likely due to the action of phosphatases that normally dephosphorylate Rad53 during recovery from checkpoint mediated arrest (Leroy *et al.* 2003). We also found that, as soon as Rad53 is dephosphorylated, histone genes are rapidly re-activated upon removal of HU in co-ordination with the restart of DNA synthesis (Figure II.3D). This is likely important to prevent runaway replication in the absence of histone synthesis. These results clearly demonstrate that the Rad53-dependent repression of histone genes upon replication stress requires the activation of the DNA damage response and is regulated by the upstream kinases Mec1/Tel1. This ensures that inappropriate Rad53-dependent repression of histone genes does not occur during a normal S-phase.

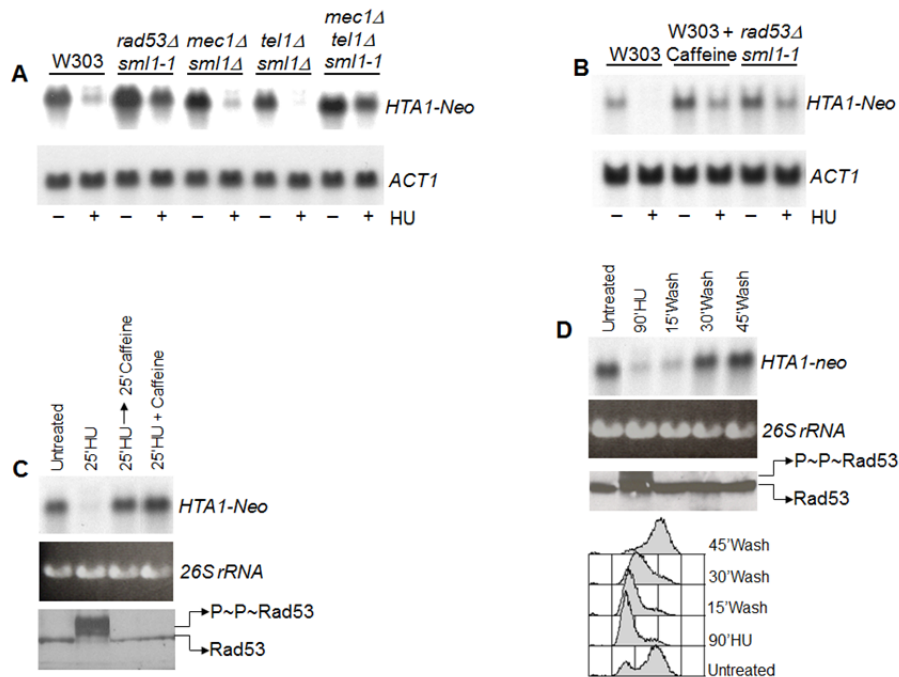


Figure II.3 Histone gene repression in response to hydroxyurea is dependent upon continuous activity of the protein kinases Mec1 and Tel1.

(A) Mec1 and Tel1 are redundant with each other for HTA1 promoter repression upon HU treatment. Asynchronous populations of the indicated strains carrying a plasmid encoding a neomycin reporter gene driven by the HTA1 promoter were either left untreated or incubated with 0.2M HU for 25 min. Northern blots were performed to detect the Neo mRNAs. ACT1 transcripts were monitored as loading controls. (B) Caffeine abolishes the HU-induced repression of the HTA1 promoter. Strains were processed as in (A), except that 0.5% caffeine was added 5 minutes prior to the addition of 0.2M HU. (C) HU-induced histone gene repression requires continuous activity of the kinases Mec1/Tel1 and correlates with Rad53 hyperphosphorylation. Asynchronously growing wild type (W303) cells carrying a plasmid encoding a neomycin reporter gene driven by the HTA1 promoter were treated with 0.5% caffeine either after treatment with 0.2M HU, or simultaneously with HU treatment, as indicated. The upper panel shows Neo reporter transcript levels, whereas the middle panel depicts the 26S rRNA levels as loading controls. The bottom panel shows an immunoblot performed to detect Rad53 phosphorylation in the same samples. (D) Histone gene transcription is reactivated following HU removal, resumption of DNA synthesis and concomitant Rad53 dephosphorylation. Asynchronously growing wild type (W303) cells carrying a plasmid encoding a neomycin reporter gene driven by the HTA1 promoter were treated with 0.2M HU for 90min. HU was then washed away and cells were grown in the absence of HU for the indicated time periods. The upper three panels are as in (C), while the bottom panel shows the FACS profiles of the cells at the time they were harvested.

Rad53 phosphorylates the Hpc2 subunit to repress histone gene transcription

Published data strongly suggest that the Hpc2 subunit of the HIR complex is phosphorylated, possibly by Rad53 and the upstream kinase Mec1 (Smolka, et al., 2007; Chen et al, 2010). However the physiological significance of this phosphorylation is not clear. We hypothesize that the checkpoint kinases phosphorylate the Hpc2 subunit of the HIR complex in response to replication arrest and downregulate histone gene transcription. Using mass spectrometric approaches we identified several Rad53 dependent phosphorylation sites on Hpc2 both *in vivo* and *in vitro* in addition to the recently published sites (Supplementary Table II.S1, figures II.4B-D and II.2, experimental procedures). None of the Hpc2 sites that we found correspond to the consensus motif for phosphorylation by Mec1/Tel1 (SQ or TQ dipeptides). We mutated several of these putative phosphorylation sites on Hpc2 (Supplementary Table II.S2) and measured the protein levels of each mutant to ensure that their expression levels were not affected by the mutations (figure II.5A). We then screened these mutants for any defects in histone gene downregulation under replication stress to identify residues that are important for downregulating histone transcript levels upon replication inhibition. Histone mRNA levels in WT cells increase 20-25 fold in S-phase and decline close to G1 levels following HU treatment (Figure II.5.B. and II.5.C.). In contrast, histone transcript levels in the *hpc2Δ* deletion strain increased 20-40 fold during S-phase but stayed high upon replication arrest with HU. The *HTA2* locus which is not repressed by the HIR complex served as a negative control (data not shown). The G1 histone mRNA levels in this mutant are also somewhat higher than in the WT cells due to the continuous low level expression of histone mRNAs throughout the cell cycle (Osley et al., 1986). Most of the *hpc2Δ* phosphorylation site mutants analyzed displayed a histone transcript downregulation comparable to the WT cells when placed under replication stress (data not shown). However, a triple mutant *hpc2Δ* S330,331,332A as well as a quadruple mutant *hpc2Δ* S305,307,308,310A not only showed higher G1 histone mRNA levels, but also a dramatic defect in histone transcript downregulation upon replication stress (Figure II.5B and C). This suggests that the serine residues that are very important for histone

gene repression in Hpc2 are clustered in two main sites. Individual mutations at these clusters/sites did not have any effect on histone gene repression, suggesting that some of the serines within each site might be redundant with each other (data not shown). Unlike the *hpc2Δ* deletion strain, the two *hpc2Δ* phosphorylation site cluster mutants were significantly but not completely defective in downregulating histone transcripts, suggesting that additional phosphorylation sites on Hpc2 may also contribute in bringing about a complete repression of the histone genes upon replication arrest.

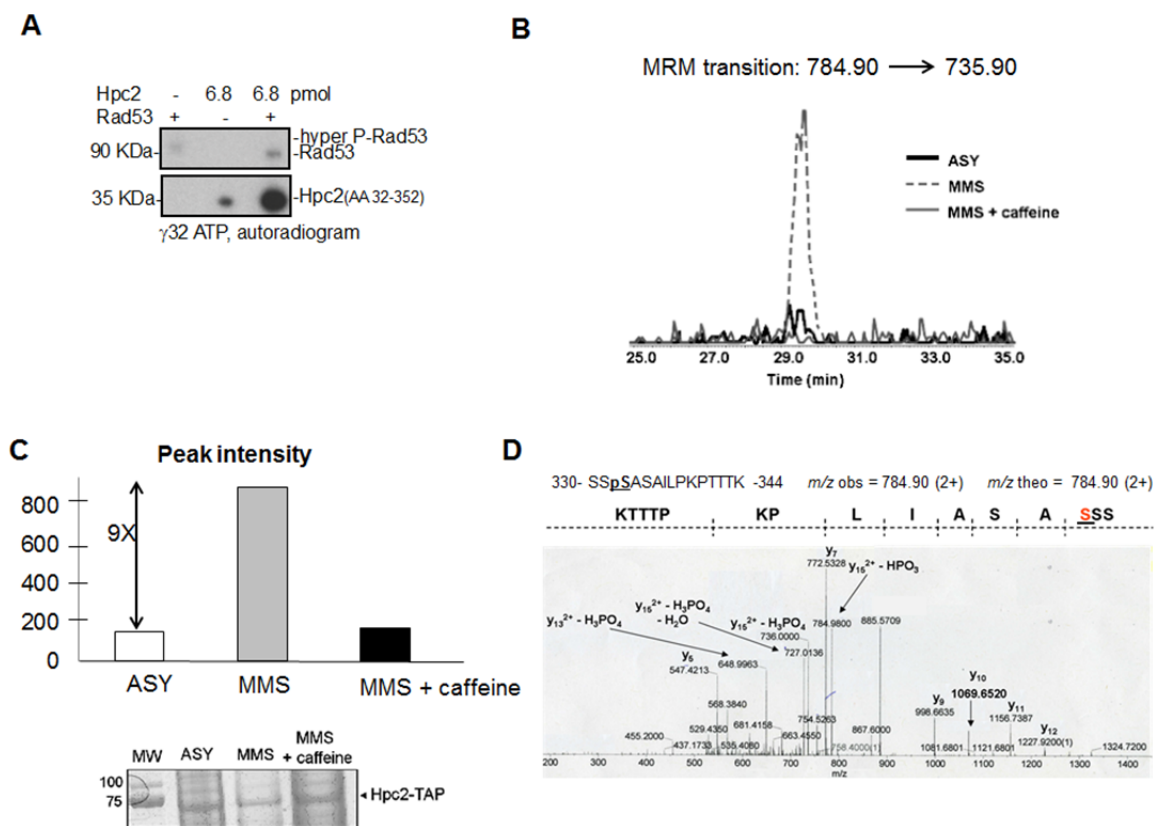


Figure II.4 Hpc2 phosphorylation *in vivo* and *in vitro*.

(A) Autoradiogram showing the [32 P]-labeled products produced after *in vitro* kinase assays performed with recombinant Rad53 and a fragment of Hpc2 (residues 32-352). (B-C) MMS-induced phosphorylation of Hpc2-Ser332 is abolished by caffeine. Asynchronous cells were either left untreated or treated for 2h with 0.035% MMS. Half of the MMS-treated culture was then incubated with 0.5% caffeine for 30 min to inhibit Mec1/Tel1. Hpc2-TAP was affinity-purified from each cell population and the abundance of Hpc2-Ser332 phosphorylation determined by MRM (see Supplement).

The graph shows the abundance of the Hpc2-Ser332 phosphopeptide as a function of its retention time during liquid chromatography. The MRM transition selected to identify the phosphopeptide containing Hpc2-Ser332 is indicated. In-gel Hpc2 abundance is shown in the bottom panel in (C) prior excising the bands. (D) Hpc2-Ser332 is phosphorylated *in vivo* in response to MMS. Hpc2-TAP was purified from MMS-treated cells and analyzed by nanoLC-MS/MS. The observed and theoretical m/z ratio of the non-fragmented precursor peptide are indicated at the top. In the MS/MS spectrum, the sequence from left to right is shown from the C-terminus to the N-terminus relative to that of Hpc2. The fragment with m/z_{obs} 648.9963 is diagnostic of Ser332 phosphorylation and formed by loss of H_3PO_4 from the doubly charged y_{13} fragment ion ($y_{13}^{2+} - \text{H}_3\text{PO}_4$): m/z_{theo} 648.87.

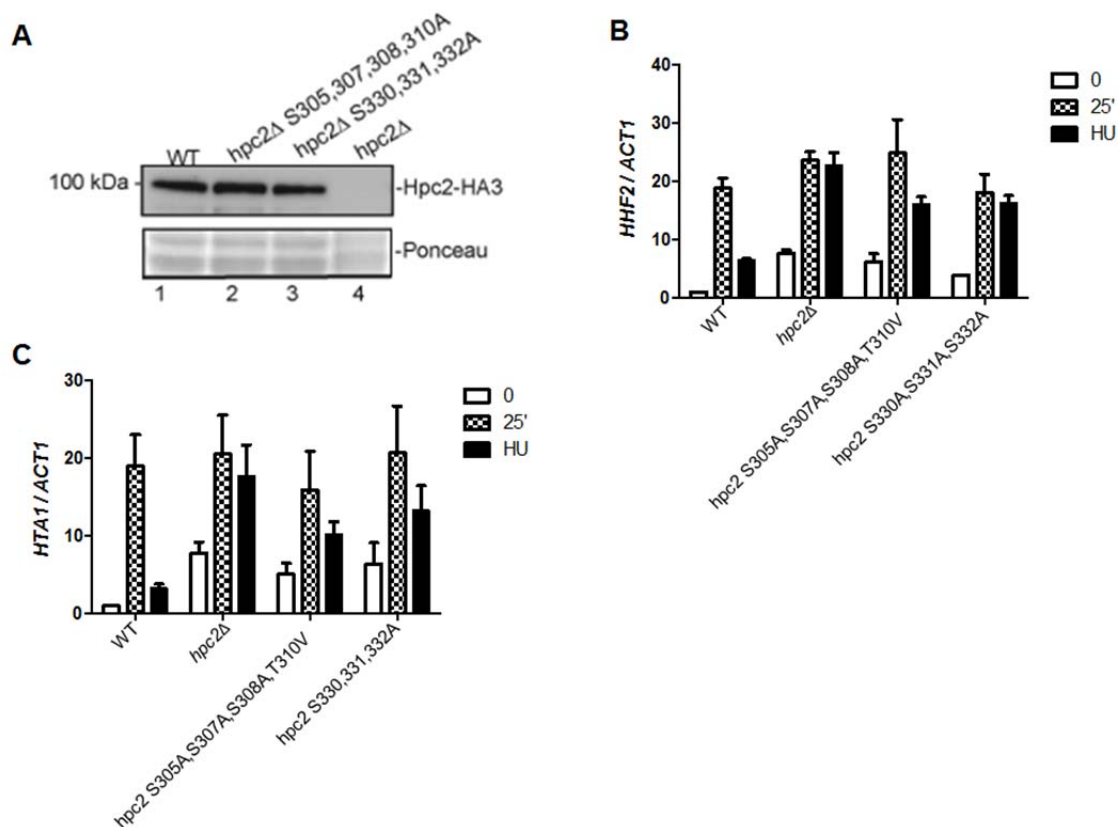


Figure II.5 Two clusters of Hpc2 residues contribute to downregulation of histone transcripts upon replication inhibition.

(A) Hpc2 mutations do not destabilize the protein. Hpc2 levels were determined by immunoblotting in asynchronously growing cell populations. (B) Hpc2 mutants are defective in downregulating *HHF2* transcripts upon HU treatment. Exponentially

growing cultures of wild-type or Hpc2 mutant cells were arrested with α -factor for two hours and released towards S-phase for 25 minutes prior to addition of 0.2M HU for 20 minutes. Total RNA was extracted from the different samples and histone mRNA levels were determined by quantitative Reverse Transcriptase (RT)-qPCR. *HHF2* mRNA levels were normalized to those of *ACT1*. *HHF2* RNA levels in each sample are expressed relative to the levels observed in WT G1 cells, which were arbitrarily set to one. (C) Hpc2 mutants were defective in downregulating *HTA1* transcripts upon HU treatment. The data were generated as described in (B), but using *HTA1*-specific primers.

Hpc2 is cell cycle regulated and is unstable at the G1/S transition

Hpc2 seems to be the key regulatory subunit of the HIR complex since other members of the HIR complex namely Hir1 and Hir2 are not cell cycle regulated (Sherwood, 1993; De Lucia, 2001; Blackwell, 2004). The HIR complex is also involved in histone gene repression outside of S-phase (Xu *et al.* 1992). In order to address the stability of Hpc2 during the cell cycle, we used a *cdc7-4* thermosensitive (ts) strain. Cdc7 is a protein kinase essential for activation of all DNA replication origins (Bousset and Diffley 1998). We synchronized the cells in G1 at permissive temperature (25°C) using α -factor. We then blocked the cells for 1 hour at the *cdc7-4* arrest point by spinning the cells to remove α -factor and adding pre-warmed (38°C) medium. Our results showed that, as expected, Hpc2 is abundant in G1 cells arrested with α -factor, when histone genes are repressed (figure II.6A). In striking contrast, Hpc2 is low in abundance and highly unstable at the *cdc7-4* arrest point (figure II.6A), when histone gene transcription is known to occur despite the fact the *cdc7-4* mutation completely blocks initiation of DNA replication. (Hereford *et al.* 1982) We also performed an experiment to monitor the stability of Hpc2-TAP after addition of the protein synthesis inhibitor cycloheximide (figure II.6B). The strain used in this experiment also carried a deletion of the *PDR5* gene. Pdr5 is a multidrug efflux pump whose absence facilitates the accumulation of intracellular MG132 (Collins *et al.* 2010). Following addition of cycloheximide alone, Hpc2 is degraded at the *cdc7-4* arrest point and this degradation is blocked by the presence of MG132 (figure II.6B).

This result strongly suggests that the degradation of Hpc2 that occurs just before the onset of DNA replication is mediated by the proteasome. Another interesting experiment shows that Hpc2 is unstable at the *cdc7-4* arrest point in G1/S transition and seems to remain unstable until early S-phase as seen in cells released in S-phase for 10 min (figure II.6C). The molecular switch that inactivates the HIR complex is likely critical for cell viability because, without HIR complex inactivation and despite the presence of activators, cells may not be able to transcribe histone genes at sufficient levels to sustain cell viability. Our results indicate that the molecular mechanism that inactivates the HIR complex during the G1/S transition involves, at least in part, cell cycle stage-dependent degradation of Hpc2.

Interestingly, Hpc2 progressively accumulates during passage through a normal S-phase (Figure II.6C, 10-, 25- and 40-min time points). Surprisingly, the abundance of Hpc2 reaches a level comparable to that observed in G1 (when Hpc2 is abundant and histone genes are repressed) well before completion of DNA replication (figure II.6C, FACS data). This observation provides a potential molecular mechanism for an intriguing observation that was made many years ago, namely the observation that histone gene transcription appeared to strongly decrease during S-phase, rather than in G2 when replication-dependent nucleosome assembly has completely ceased to occur (Hereford *et al.* 1982).

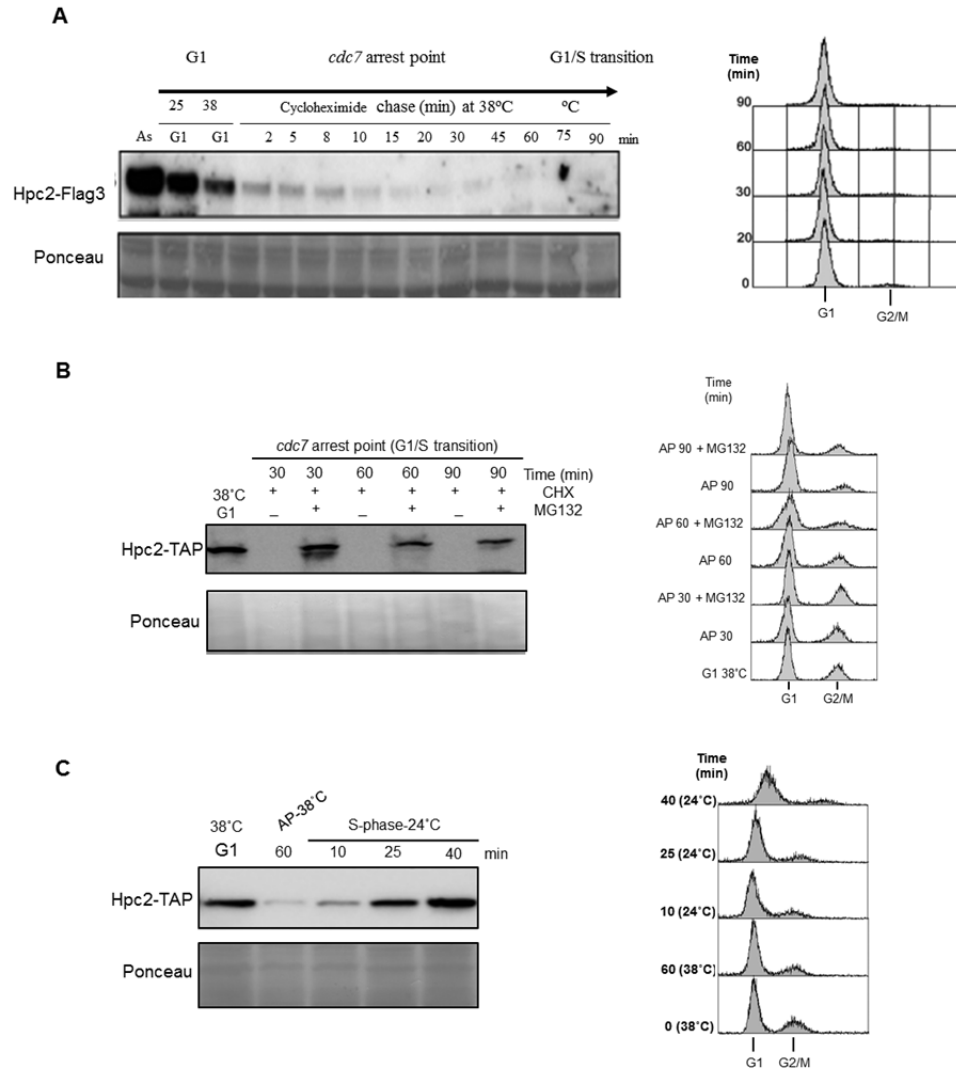


Figure II.6 Hpc2 is degraded during the G1-S transition and stabilized in mid S-phase.

(A) Hpc2-Flag3 *cdc7-4* cells were released from α -factor at 38°C and blocked at the *cdc7* arrest point. (B) Cycloheximide chase of Hpc2-TAP in *pdr5 delta cdc7-1* strain where cells were released from α -factor at 38°C and blocked at the *cdc7* arrest point with X μ M of cycloheximide and 50 μ M of MG132. (C) Hpc2-TAP *cdc7-4* cells were released from α -factor at 38°C and blocked at the *cdc7* arrest point for 1 hour then the cells were released in S-phase at 24°C. Aliquots of the culture were then collected at 10, 25 and 40 min. In A-C, tagged Hpc2 was detected by immunoblotting, PCNA and/or Ponceau S staining are shown as loading controls and cell synchronization was monitored by FACS.

Hpc2 phosphorylation by Rad53 is required to recruit RSC to histone gene promoters

Rad53 could potentially repress transcription by promoting the recruitment of repressors to histone gene promoters. In response to HU, HIR proteins are necessary for repression of three of the four histone gene promoters (*HTA1-HTB1*, *HHT1-HHF1*, *HHT2-HHF2*) but not *HTA2-HTB2*. Their repressive effect at these three promoters is dependent upon the *NEG cis*-acting element (figure II.1A) and may be facilitated by the HIR dependent recruitment of the RSC chromatin remodeler to the promoters, which correlates with their repression (Ng et al., 2002). Hence, we explored the role of Rad53 in the recruitment of RSC to histone gene promoters. We readily detected the recruitment of three distinct Myc-tagged subunits of the RSC chromatin remodeling complex (Rsc1, Rsc3, and Rsc8) to the *HTA1-HTB1* promoter following addition of HU to asynchronous cells (Figure II.7 and data not shown). Upon removal of HU, RSC occupancy at the *HTA1* promoter decreased to basal levels (figure II.7A, top panel). This HU-induced recruitment of RSC to the *HTA1* promoter was abolished in cells lacking either Rad53 or the Hir/Hpc proteins (figure II.7A, top panel). Next we investigated whether the recruitment of RSC to histone gene promoters was altered in our two Hpc2 phosphorylation site mutants that fail to downregulate histone transcripts efficiently in response to replication stress (figure II.5). We find that both of these Hpc2 phosphorylation site mutants are defective in the HU-induced recruitment of RSC to histone gene promoters (figure II.7B). Furthermore, we assessed recruitment of the HIR complex at the *HTA1* promoter by ChIP in an *hpc2* Δ strain containing a plasmid for expression of a TAP-tagged Hpc2 phosphorylation mutant that combines mutations of the two previously described phosphorylation site clusters. This ‘mega mutant’ contains 15 point mutations in the so-called ST region (Serine/Threonine-rich region) and the mutations were made between amino acids 305 to 334 within that region:
S/T305,307,308,310,312,314,317,318,319,323,324,330,331,332,334A/V. Despite the fact that we tried numerous times to ChIP wild-type Hpc2-TAP at the *HTA1*

promoter, this approach did not work for unknown reasons. To overcome this problem, we decided to ChIP Hir2-TAP, one of the four members of the HIR complex that was successfully ChIPed to histone gene promoters (Fillingham *et al.* 2009). Compared with a strain expressing wild-type Hpc2, we expected a decrease in the association of Hir2-TAP with the *HTAI* promoter in cells expressing the Hpc2 mega mutant. Surprisingly, the association of Hir2-TAP with the *HTAI* promoter was not impaired by the mega mutation of Hpc2 (Figure II.7C). Thus, mutation of multiple phosphorylation sites located in the S/T region of Hpc2 did not impair recruitment of the HIR complex to the *HTAI* promoter.

Since Rad53 is needed to repress histone genes in S-phase cells treated with HU, we expected that, under these conditions, Hpc2 would be abundant in wild-type cells but not in cells lacking Rad53. This is indeed what we observed. Hpc2-FLAG3 was far more abundant in WT cells treated with HU than in *rad53Δ sml1Δ* mutants. In gels optimized to resolve proteins that exist in multiple phosphorylation sites (so-called Phos-Tag gels), Hpc2 migrates as broad smear, presumably because it contains a multitude of phosphorylation sites. This is clearly the case in S-phase cells treated with HU (Figure II.7D). Although Hpc2 is far less abundant in *rad53Δ sml1Δ* mutant treated with HU, there is a residual amount of Hpc2 that is detected by immunoblotting (Figure II.7D). Consistent with the fact that Rad53 phosphorylates multiple sites in Hpc2, the pool of Hpc2 detected in HU-treated cells that lack Rad53 migrates considerably faster in Phos-Tag gels than the extensively phosphorylated forms observed in wild-type cells treated with HU (Figure II.7D). These results prompted us to investigate whether Hpc2 phosphorylation cluster mutants were less abundant than wild-type Hpc2 in S-phase cells treated with HU. Unfortunately, the Hpc2 phosphosite mutants were nearly as abundant as wild-type Hpc2 in HU-treated cells (supplementary figure II.S3). This result suggests that, although Rad53 is necessary for Hpc2 to accumulate in HU-treated cells, the cluster of phosphorylation site mutations that we introduced in the S/T region of Hpc2 did not prevent HU-

induced accumulation of Hpc2. However, we cannot exclude the possibility that other phosphorylation sites might be important for accumulation of Hpc2 and, therefore, histone gene repression in response to HU. Overall, we conclude that Rad53-dependent phosphorylation of Hpc2 is crucial for recruitment of RSC to histone gene promoters and, by inference, for the repression of histone genes triggered by agents that impede DNA replication.

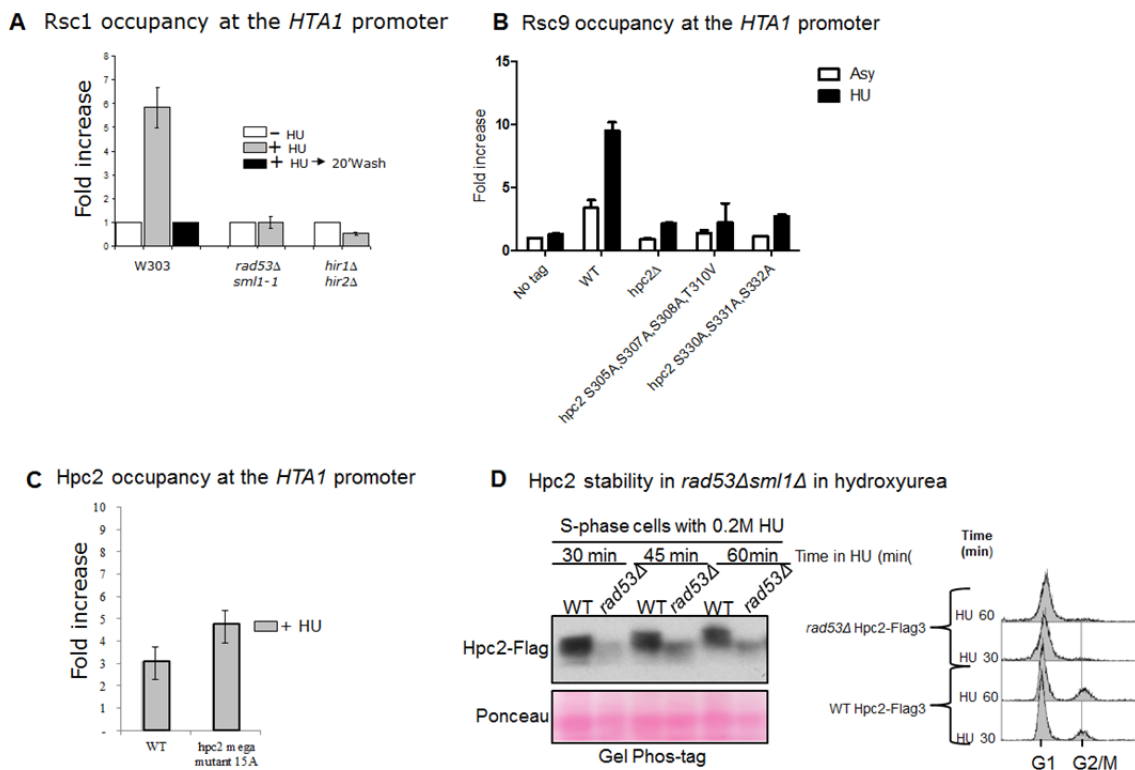


Figure II.7 HU-induced repression of the *HTA1-HTB1* promoter is triggered by Rad53 and phosphorylated Hpc2 dependent recruitment of the RSC chromatin remodeling complex to the promoter.

(A) Rsc1 is recruited to the *HTA1* promoter in response to HU. Asynchronously growing wild type (W303), *rad53Δ* and *hir1Δ hir2Δ* mutant cells expressing Rsc1-Myc were fixed with formaldehyde either before (0 min) or 40 min after HU addition. HU-induced recruitment of Rsc1-Myc to the *HTA1-HTB1* promoter was quantified using chromatin immunoprecipitation assays and quantitative PCR as described under Experimental Procedures. For each immunoprecipitated DNA sample, PCR was performed in triplicate and the signal for the *HTA1-HTB1* promoter was normalized to background signal derived from the *MATa* locus. The ratio of the two signals before HU addition was assigned a value of 1. The bar graph shows an average of

data from three to four independent experiments for each strain. **(B)** Hpc2 phosphorylation sites are required for HU-induced recruitment of the RSC complex to histone gene promoters. The bar graph was obtained as described in (A) and demonstrates that HU-induced recruitment of the Rsc1-13Myc protein to the *HTAI* promoter is abolished in Hpc2 mutants lacking either of the two phosphorylation site clusters. **(C)** Hpc2 mega mutant is recruited to the *HTAI* promoter in HU. The bar graph was obtained as described in (A) and demonstrates that HU-induced recruitment of the Hir2-TAP protein to the *HTAI* promoter still occurred in Hpc2 mega mutant. **(D)** Hpc2-Flag3 WT or *rad53Δsml1Δ* cells were released from α -factor and treated with 0.2 M HU for 30, 45 and 60 min. Hpc2 stabilization in HU requires Rad53.

Rad53 associates with both Hir/Hpc proteins and the RSC complex

To gain more insight into the molecular mechanism of genotoxic agent-induced histone gene repression, we investigated potential interactions among the factors known to be involved in this response, namely Rad53, Hir/Hpc proteins and the RSC complex. We found that Rad53 interacts with at least three of the four Hir/Hpc proteins (Hir1, Hir2 and Hir3). This interaction is not affected in response to HU treatment (Figure II.8A). We consistently find higher amounts of histones associated with the Hir/Rad53 complexes upon HU treatment, suggesting that this complex may serve as a sensor for histone levels (Figure II.8A). The higher amounts of histones present in these complexes in HU-treated cells may alert Rad53 to the presence of excess histone proteins, thus priming Rad53's latent potential to repress histone genes. We also find a constitutive interaction between RSC and Hir/Hpc proteins which remains unaffected in response to HU (Figure II.8B). Thus, these two major repressors of histone genes physically interact with each other. Unfortunately, several controls are missing in figure II.8. It would be important to include the whole cell extracts and the no-tag controls for the immunoprecipitation experiments. This figure was obtained by Dr. Gunjan's laboratory and the strains were not available to redo the experiments and include the controls at the moment of submitting this thesis. We decided to still show the figure because the concept of the HIR complex interaction with the RSC complex is interesting.

The Rad53-dependent recruitment of RSC to histone gene promoters (Figure II.7A) suggested that these proteins might interact physically. Indeed, we found that Rad53 interacts with the RSC complex in untreated exponentially growing cells (Figure II.8C). This interaction appears to intensify slightly in response to HU, which correlates well with the Rad53-dependent recruitment of RSC to histone gene promoters in HU (Figure II.7A). Taken together, these results suggest that the complex interplay of Rad53, Hir/Hpc proteins and the RSC complex may serve as a switch that is sensitive to histone levels and triggers histone gene repression upon inhibition of DNA replication and the consequent accumulation of excess histone proteins.

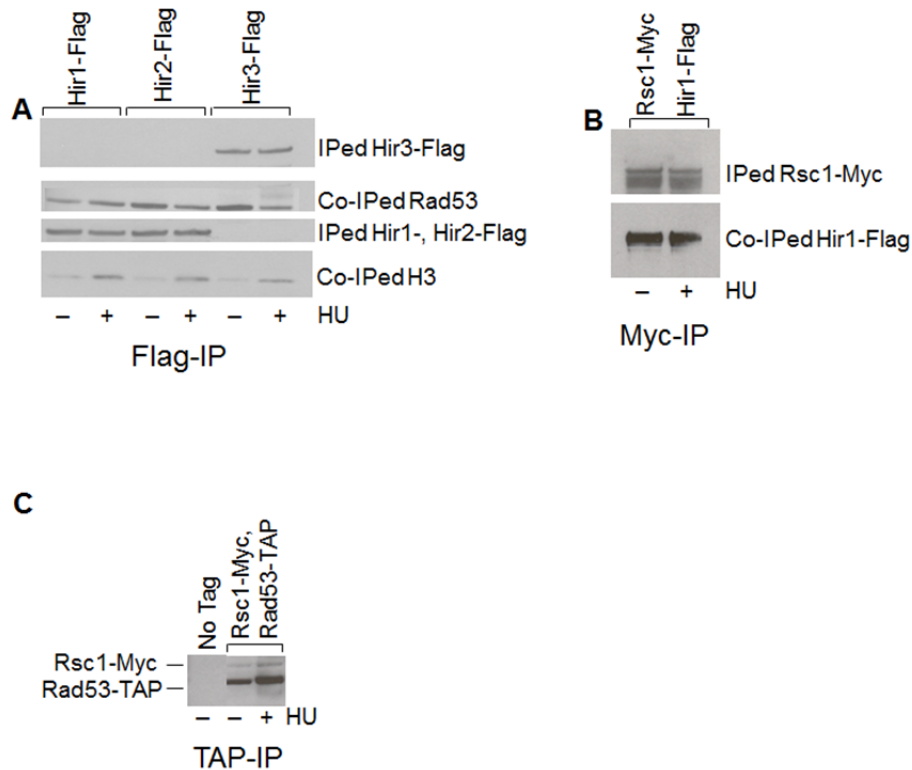


Figure II.8 Physical interactions between Rad53, Hir proteins and the RSC complex.

(A) Rad53 interacts with Hir protein complexes that accumulate high amounts of histones in response to HU. Wild type cells expressing Flag-tagged Hir1, 2 or 3 proteins were left untreated or incubated with 0.2M HU for 90min. Cells were harvested and whole cell extracts (WCEs) were prepared as described under Experimental Procedures. Flag-tagged proteins were immunoprecipitated (IPed) from the WCEs. The presence of the Flag-tagged proteins in the immunoprecipitate, as well as co-immunoprecipitated (co-IPed) Rad53 and histone H3 was detected by immunoblotting. (B) Hir1 interacts constitutively with the RSC complex. Wild type cells expressing Hir1-FLAG and Rsc1-Myc were left untreated or incubated with 0.2M HU for 90min and processed as in (A), except that Myc-tagged Rsc1 was IPed. The tagged proteins were detected by immunoblotting. (C) Rad53 interacts with the RSC complex. Wild type cells expressing both Rsc1-Myc and Rad53-TAP or a negative control strain lacking epitope tag were processed as in (A) and Rad53-TAP was IPed using IgG-Sepharose. The IPed and co-IPed proteins were detected by immunoblotting for the tagged proteins.

II.5. Discussion

In yeast, excess histones interfere with mitotic chromosome segregation (Meeks-Wagner and Hartwell 1986) and gene expression (Clark-Adams *et al.* 1988, Singh *et al.* 2010). In addition, excess histones sensitize cells to several types of genotoxic agents that interfere with replication and are commonly used in cancer chemotherapy (Gunjan and Verreault 2003). Hence, it is crucial that cells maintain a strict control over their histone levels.

Multiple mechanisms to prevent the accumulation of excess histones

We previously reported that the DNA damage checkpoint kinase Rad53 triggers degradation of excess histones (Gunjan and Verreault 2003). Here, we demonstrate that Rad53 is also required to repress transcription of histone genes in response to agents that slow down DNA replication during S-phase. This novel function of Rad53 likely reinforces its role in the degradation of excess histones. Rad53 represses transcription by promoting the phosphorylation of the Hpc2 subunit of the HIR complex, leading to the recruitment of the chromatin remodeling complex RSC to the four core histone gene promoters in response to genotoxic agents that impede replication. Even the *HTA2-HTB2* promoter, which is not repressed by other known regulators of histone gene transcription such as the Hir/Hpc proteins and Asf1 (Osley and Lycan 1987, Sutton *et al.* 2001), is repressed by Rad53 and RSC. This may be important because the *HTA1-HTB1* promoter is subject to dosage compensation and is normally upregulated in cells that cannot express *HTA2-HTB2* (Moran *et al.* 1990). Therefore, both H2A/H2B gene pairs may need to be co-repressed in concert with H3/H4 genes to curtail the accumulation of excess histones and prevent the formation of an imbalance between H2A/H2B dimers and H3/H4 tetramers, a condition that interferes with gene expression (Clark-Adams *et al.* 1988) and potentially has other deleterious effects.

The dual role of Rad53 in histone gene repression and degradation of excess histones raises an interesting issue. At least superficially, these two modes of regulation appear to be redundant with each other. However, early S-phase cells need to synthesize large amounts of histones at very high rates to meet the demand for rapid histone deposition behind the replication fork (Figure II.6C). The sudden decline in rates of DNA synthesis that follows DNA damage during S-phase therefore results in a substantial accumulation of excess histones (Bonner *et al.* 1988, Gunjan and Verreault 2003). Because they form a complex with Rad53 and the multi-functional ubiquitin-conjugating enzymes involved in their degradation (Bonner *et al.* 1988, Gunjan and Verreault 2003, Groth *et al.* 2005), excess histones would eventually saturate the degradation machinery if they were allowed to be synthesized continuously in the absence of genotoxic agent-induced histone gene repression. This may ultimately interfere with other important functions of Rad53, such as the phosphorylation of target proteins at sites of stalled replication forks.

Regulation of histone gene repression

The fact that Rad53 has the potential to repress histone gene transcription raises an important question. Clearly, the latent potential of Rad53 to repress histone genes needs to be carefully controlled to avoid inappropriate repression during normal progression through S-phase. This is because cells that complete S-phase in the absence of histone gene transcription lose viability (Kim *et al.* 1988). Here we show that the ability of Rad53 to function as a histone gene repressor is only unmasked in response to replication interference, when Rad53 is activated by the upstream kinases Mec1/Tel1. The initial trigger to repress histone gene transcription may be the presence of stalled replication forks. At least two distinct initiation mutants that we tested (*cdc7* and *cdc45*) fail to repress histone gene transcription even when the mutants are held for long periods of time just before the onset of DNA replication (Lycan *et al.* 1987). In contrast, thermo-sensitive mutations that stall DNA synthesis

mimic the effects of HU or MMS and trigger histone gene repression (Lycan *et al.* 1987). This is reminiscent of the requirement for stalled replication forks to activate the kinase activity of Rad53 in the presence of the alkylating agent MMS. Cells held at the *cdc7* arrest point do not activate Rad53 in response to a low dose of MMS, whereas cells that progress beyond the initiation step readily activate Rad53 (Tercero *et al.* 2003).

An inevitable consequence of DNA lesions that slow down or block DNA replication forks is the accumulation of newly synthesized histones. This was demonstrated by monitoring the amounts of histones bound to several nucleosome assembly factors before and after treatment with drugs that interfere with replication (Emili *et al.* 2001, Gunjan and Verreault 2003, Groth *et al.* 2005). Thus, it is possible that the signal to repress histone gene transcription is simply the accumulation of newly synthesized histones above a certain threshold. This notion is consistent with several lines of evidence. In yeast, cells with reduced levels of H2A/H2B as a result of an *HTA1-HTB1* disruption cannot repress transcription of *HTA2-HTB2* in response to HU (Baumbach *et al.* 1984). This phenomenon may be conserved because, even in human cells, inhibitors of protein synthesis prevent the subsequent repression of histone genes that is induced by drugs that slow down replication (Baumbach *et al.* 1984, Sive *et al.* 1984). Yeast cells also have a mechanism that downregulates expression of the *HTA1-HTB1* promoter in cells carrying multiple copies of the H2A and H2B genes (Moran *et al.* 1990). This feedback inhibition of *HTA1-HTB1* transcription is Hir protein-dependent and requires high levels of H2A/H2B because frameshift mutations that prevent H2A/H2B protein synthesis from the additional gene copies abrogate the repression (Moran *et al.* 1990).

In normally proliferating cells, both Asf1 (Emili *et al.* 2001, Hu *et al.* 2001) and excess histones (Gunjan and Verreault 2003, Kumar Singh *et al.* 2007) associate with Rad53. Here we show that the Hir proteins also co-purify with Rad53 (Figure II.8A; also see (Gavin *et al.* 2002). *asf1Δ* mutants exhibit lower steady state levels of histone transcripts and are slightly impaired in HU-induced histone gene repression (Sutton *et al.* 2001). On the other hand, Hir/Hpc proteins are absolutely required for both the HU-induced and the cell cycle-dependent histone gene repression outside of S-phase. Hir/Hpc proteins interact with both Asf1 (Green *et al.* 2005, Tang *et al.* 2006) and Rad53 (Figure II.8A). Histones that accumulate above a critical threshold in these complexes in response to lesions that slow down replication may serve to signal that the histone genes should be repressed. Interestingly, the complex between Asf1 and Rad53 is altered in response to several genotoxic agents that interfere with DNA replication (Emili *et al.* 2001, Hu *et al.* 2001), though the interactions between Hir proteins and Rad53 remain unaffected (Figure II.8A). This suggests that, when replication is impeded, the Rad53 complex may generate “modified” forms of Hir proteins that are competent to trigger histone gene repression. Consistent with this idea, we find that the Hpc2 subunit of the HIR complex is a key target of Rad53 whose phosphorylation elicits histone gene repression via the recruitment of the RSC complex (figure II.7B). Moreover, we demonstrated that the Hpc2 protein accumulates during an unperturbed S-phase and reaches levels close to those observed in G1 prior to completion of S-phase (figure II.6C). This is surprising given that new histones are needed in large amounts for nucleosome biogenesis during replication of the entire genome. However, our results are consistent with an observation, made many years ago, suggesting that histone genes are repressed prior to completion of genome duplication. Thus, *S. cerevisiae* cells intriguingly seem to repress histone genes when the total rate of DNA synthesis diminishes as cells progress from early to late S-phase. We showed that Rad53 is dispensable for histone gene repression in G1 or G2 (figure II.1). Thus, it seems likely that other factors including protein kinases may interact with newly synthesized histones to detect their

accumulation and trigger histone gene repression by the HIR complex in G1, mid S-phase and G2 (Hereford *et al.* 1982).

Mechanism of histone gene repression

Once the decision to repress histone gene transcription has been taken, Rad53 probably activates a cascade of events that culminates in the coordinate repression of the four core histone gene promoters. One of those events is the recruitment of the chromatin remodeling complex RSC to the histone gene promoters. Both *hirΔ/hpc2Δ* mutant cells or cells lacking the *NEG* element through which Hir/Hpc proteins repress histone genes fail to recruit RSC to histone gene promoters in response to HU (Ng *et al.* 2002). Although Hir proteins are constitutively expressed during the cell cycle (Sherwood *et al.* 1993), its Hpc2 subunit is phosphorylated by checkpoint kinases in response to replication arrest to repress histone genes by recruiting RSC. Although the interaction between Rad53 and RSC increases slightly upon HU treatment (Figure II.8C) and RSC is recruited to the histone gene promoters under these conditions (Figure II.7), it is unlikely that Rad53 itself is stably recruited to histone gene promoters since we have not been able to detect binding of Rad53 to histone gene promoters by ChIP. A third possibility is that RSC and/or Hir/Hpc proteins continuously shuttle on and off the histone gene promoters and also come into regular contact with “inactive” Rad53. Photobleaching of GFP fusion proteins has revealed that transcription factors associate with their DNA binding sites only very transiently *in vivo* (Becker *et al.* 2002). Such a dynamic equilibrium would provide an opportunity to replace histone gene promoter-binding factors, such as Hir/Hpc proteins or RSC, by their “Rad53-modified” forms. This would promote repression without any requirement for Rad53 to be recruited at the promoter.

Once recruited to histone gene promoters, the RSC complex presumably alters nucleosome positioning to create a repressive chromatin environment that inhibits transcription. As reported for repression of the *CHAI* gene (Moreira and Holmberg 1999), RSC may impose nucleosome positioning over the TATA box or other *cis*-acting elements that are critical for histone gene transcription. An intriguing possibility is that RSC may cooperate with the Asf1-HIR protein complex (Green *et al.* 2005) to promote nucleosome assembly at the histone gene promoters. Interestingly, ASF1 is targeted to specific loci in *Drosophila* polytene chromosomes and the ATP-dependent remodeling complex Brahma, which mediates both gene expression and repression, interacts physically and genetically with ASF1 (Tyler *et al.* 1999, Moshkin *et al.* 2002). Asf1 and Hir1 were found to promote rapid nucleosome assembly upon phosphate-induced repression of the *PHO5* promoter (Schermer *et al.* 2005). Promoter repression by replication-independent nucleosome assembly is widespread in yeast (Lee *et al.* 2004, Zabaronick and Tyler 2005). Thus, it seems likely that complexes of Asf1-Hir proteins bound to H3/H4 (Green *et al.* 2005) may be recruited to deposit histones and repress the transcription of specific promoters, including those of the histone genes, via interactions with promoter DNA-bound factors.

Evolutionary conservation

Higher eukaryotes utilize two distinct strategies to elicit the rapid disappearance of histone mRNAs following replication arrest. They not only repress histone gene transcription (Sittman *et al.* 1983), but also trigger rapid degradation of histone mRNAs (Sittman *et al.* 1983, Baumbach *et al.* 1984, Kaygun and Marzluff 2005). The latter response is likely mediated by a dedicated 3'-exonuclease that recognizes the terminal stem-loop that is unique to histone RNAs (Dominski *et al.* 2003, Yang *et al.* 2006). This suggests that histone mRNAs may need to be downregulated faster than would be possible by transcriptional repression alone. Interestingly, the

Mec1/Tel1-related protein kinase ATR, a key mediator of the response to DNA damage during S-phase, is needed for degradation of histone RNAs following treatment of human cells with replication inhibitors (Kaygun and Marzluff 2005). Thus, although the detailed mechanisms may be different, the role of checkpoint kinases in genotoxic agent-induced downregulation of histone RNAs is conserved from yeast to human cells.

II.6 Supplemental material

Table II.S 1 Hpc2 phosphorylation sites

<u>Phosphorylated residue</u>	<u>Peptide</u>	<u>Identified</u>	<u>Reference</u>
Ser47	44-ETG p SDSEDLFNK-55	<i>In vitro</i>	This study
Thr173	168-ISSLL p TISSNEDSK-181	<i>In vitro</i>	"
Ser175	168-ISSLLT p SSNEDSK-181	<i>In vitro</i>	"
Ser273	263-TSSPVNLDVE p STAQSLGK-280	<i>In vitro</i>	"
Ser284 or Ser285	281-FNK p(ST) NSLK-289	<i>In vitro</i>	"
Thr293	290-AAL p TKAPAEK-299	<i>In vitro</i>	"
Ser307	305-S p SSVTNSDSNISSSK-320	<i>In vitro</i>	"
		<i>In vivo</i>	Chen <i>et al</i> , 2010
Ser312	305-SISSVTN p SDSNISSSK-320	<i>In vitro</i>	This study
		<i>In vivo</i>	Chen <i>et al</i> , 2010
Ser332	329-KSS p SASAILPKPTTTK-344	<i>In vitro</i>	This study
		<i>In vivo</i>	"

Table II.S 2 Hpc2 mutants tested for HU-induced histone gene repression *in vivo*

<i>hpc2 phospho-mutant strain</i>	Defect in HU-induced histone gene repression
S307-308A	No
S305-307-308-310A	Yes
S312-314A	No
S312-314D	No
S317-318-319A	No
S317-318-319D	No
S330-332A	Yes
S330-332D	Yes
T45D S47D S49D	No
S83D	No
S223A S224A	No
S223D S224D	No
T263V S264A S256A	No
T263D S264D S256D	No
S338A S389A S391A S392A	No
S338D S389D S391D S392D	No
S435A	No
S435D	No

Table II.S 3 Yeast strains used in this study

All strains are congenic to W303-1A.

Strain	Genotype	Reference
W303-1A	<i>MATa ho ade2-1 trp1-1 can1-100 leu2-3,112 his3-11,15 ura3-1</i>	Thomas and Rothstein, 1989
U960-5C	<i>MATa rad53::HIS3 sml1-1 RAD5⁺</i>	Zhao et al., 1998
CY2034	<i>MATa rad53K227A::KanMX4</i>	Pelliccioli et al., 1999
U953-61A	<i>MATa mec1::TRP1 sml1::HIS3 RAD5⁺</i>	Zhao et al., 1998
Y662	<i>MATa tel1::HIS3</i>	D'Amours and Jackson, 2001
DDY064	<i>MATa mec1::TRP1 tel1::HIS3 sml1-1</i>	"
YAG121	<i>MATa rsc1::RSC1-13MYC-TRP1</i> in W303-1a	This study
YAG122	<i>MATa rsc1::RSC1-13MYC-TRP1</i> in U960-5C	"
YAG123	<i>MATa rsc1::RSC1-13MYC-TRP1 hir1::HIR1-FLAG3-HIS3</i>	"
YAG124	<i>MATa rsc1::RSC1-13MYC-TRP1 rad53::RAD53-TAP-URA3</i>	"
YAG125	<i>MATa rsc1::RSC1-13MYC-TRP1 hir1::HIS3 hir2::URA3</i>	"
YAG126	<i>MATa hir1::HIR1-FLAG3-HIS3 rad53::RAD53-TAP-TRP1</i>	"
YAG127	<i>MATa hir2::HIR2-FLAG3-HIS3 rad53::RAD53-TAP-TRP1</i>	"
YDL74	<i>MATa hir3::HIR3-FLAG3-LEU2 rad53::RAD53-TAP-TRP1</i>	"
YDL79	<i>MATa hpc2::HPC2-FLAG3-LEU2</i>	"
YKB2	<i>MATa cdc7-4</i>	Bousset and Diffley, 1998
YVV64	<i>MATa cdc7-4 hpc2::HIS3</i>	This study
YDL82	<i>MATa cdc7-4 hpc2::HPC2-FLAG3-LEU2</i>	"
YJP101	<i>MATa rsc9::RSC9-13MYC-TRP1</i> in W303-1a	"
YJP102	<i>MATa rsc9::RSC9-13MYC-TRP1</i> in U960-5C	"
YVV124	<i>MATa hir2::HIR2-TAP-HIS3 hpc2::KANMX</i>	"
YVV133	<i>MATa rsc9::RSC9-TAP-HIS3 hpc2::KANMX</i>	"
<i>hpc2Δ</i>	<i>MAT a hpc2Δ::KanMX</i> in BY4741 background	Open Biosystems

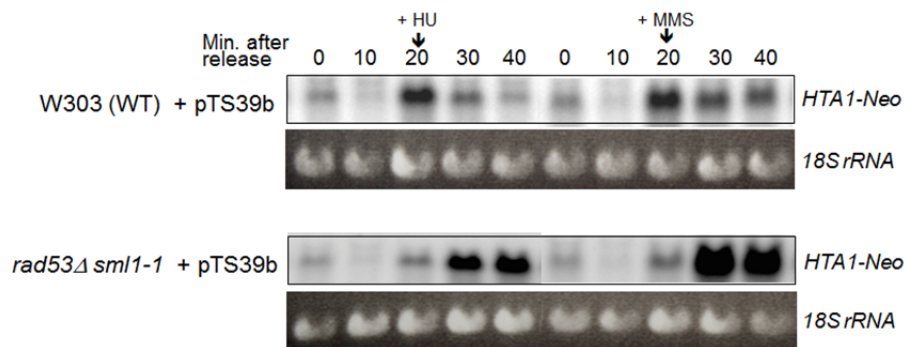


Figure II.S1 Rad53 is required for repression of the *HTA1* promoter in response to genotoxic agents that interfere with DNA replication.

Wild type (W303) and *rad53* mutant strains carrying a plasmid (pTS39b) encoding a neomycin reporter gene driven by the *HTA1* promoter were released from α -factor arrest. 0.2M HU or 0.1% MMS was added at the beginning of S-phase to interfere with DNA replication. Northern blots were performed to detect the *Neo* mRNAs. Ethidium bromide stained 18S rRNA levels are shown as loading control.

Figure S2A

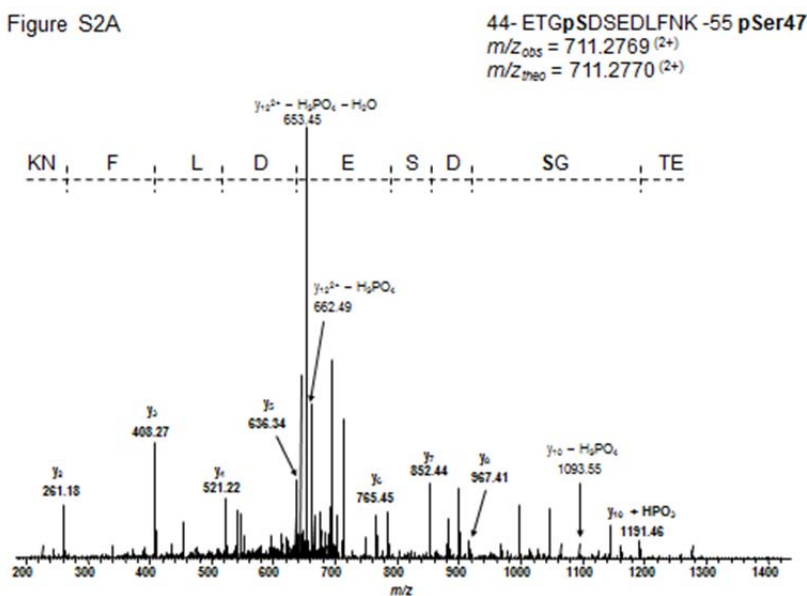


Figure S2B

168-ISSLLpTISSNEDSK-181 pThr173

$m/z_{obs} = 787.3711$ (2^+)

$m/z_{theo} = 787.3715$ (2^+)

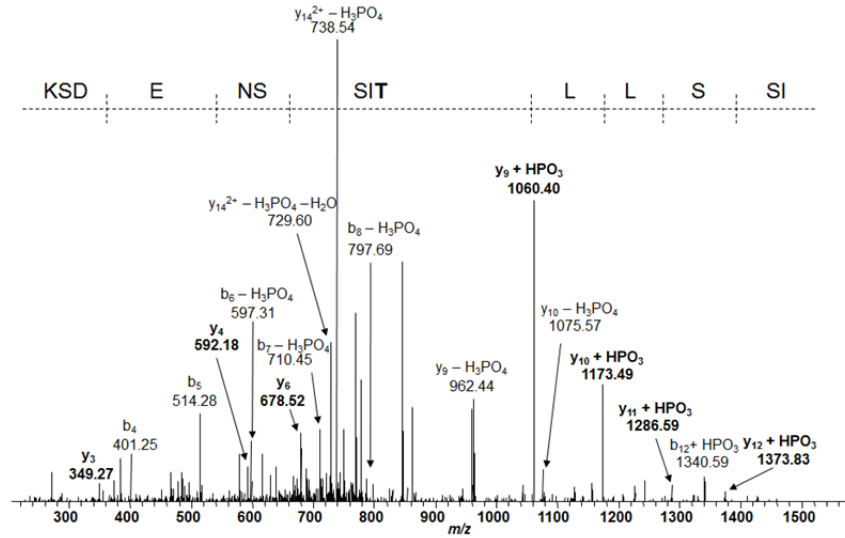


Figure S2C

168- ISSLLpSSNEDSK -181 pSer175

$m/z_{obs} = 787.3718$ (2^+)

$m/z_{theo} = 787.3715$ (2^+)

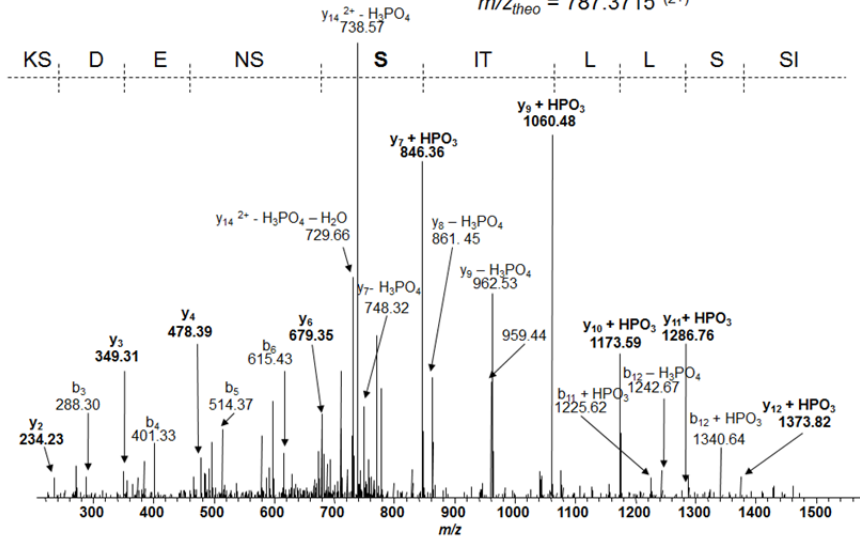


Figure S2D

263- TSSPVNLDVE**p**STAQSLGK -280 **pSer273**

$m/z_{obs} = 956.9479$ (2+)

$m/z_{theo} = 956.9485$ (2+)

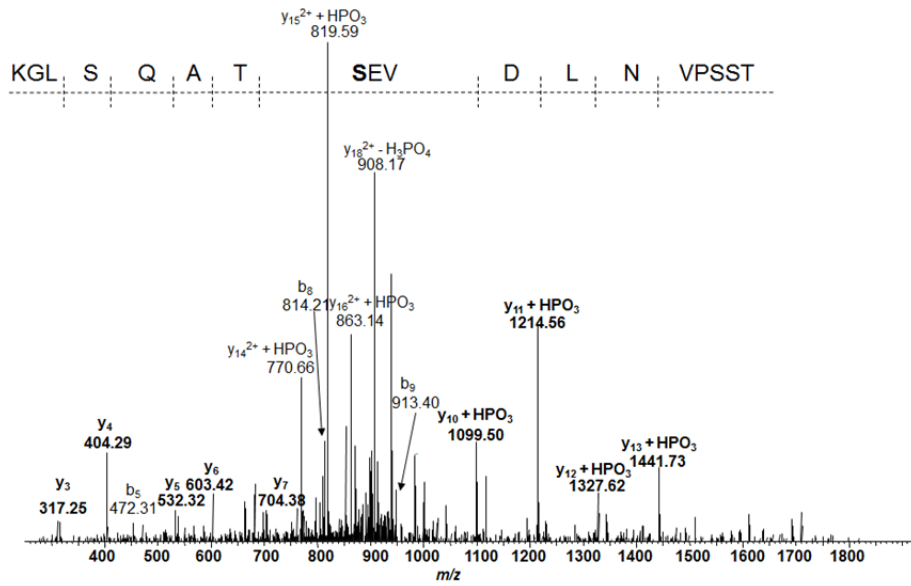


Figure S2E

281- FNK**p**(ST)NSLK -289 **pSer284** or **pThr285**

$m/z_{obs} = 559.7657$ (2+)

$m/z_{theo} = 559.7657$ (2+)

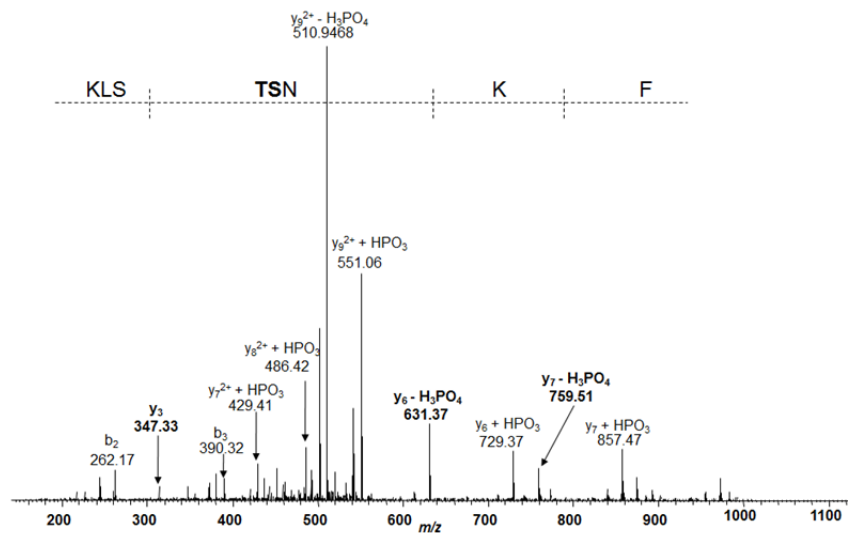


Figure S2F

290- AALpTKAPAEK -299 pThr293

$m/z_{obs} = 540.2776$ (2+)

$m/z_{theo} = 540.2785$ (2+)

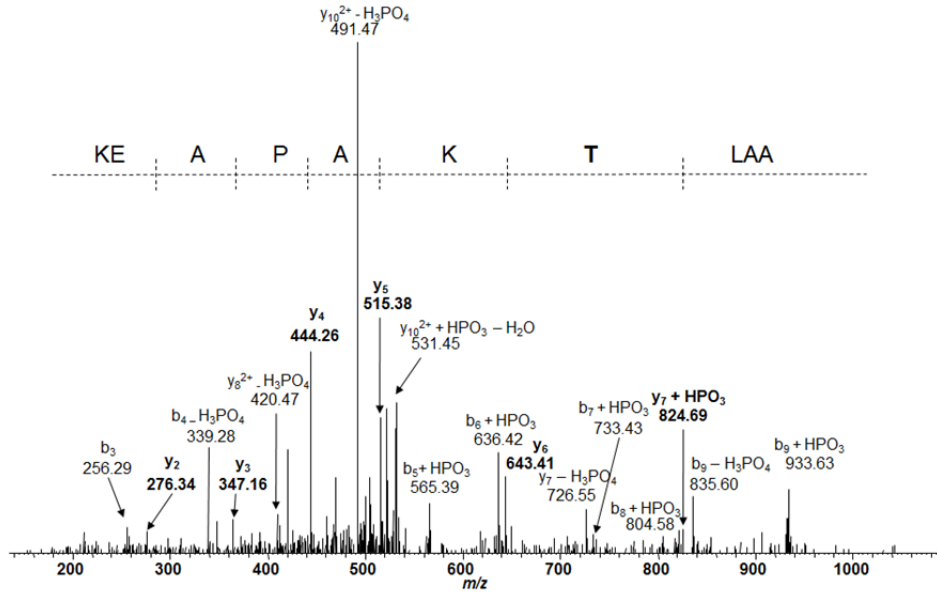


Figure S2G

305- SlpSSVTNSDSNISSK -320 pSer307

$m/z_{obs} = 846.8649$ (2+)

$m/z_{theo} = 846.8698$ (2+)

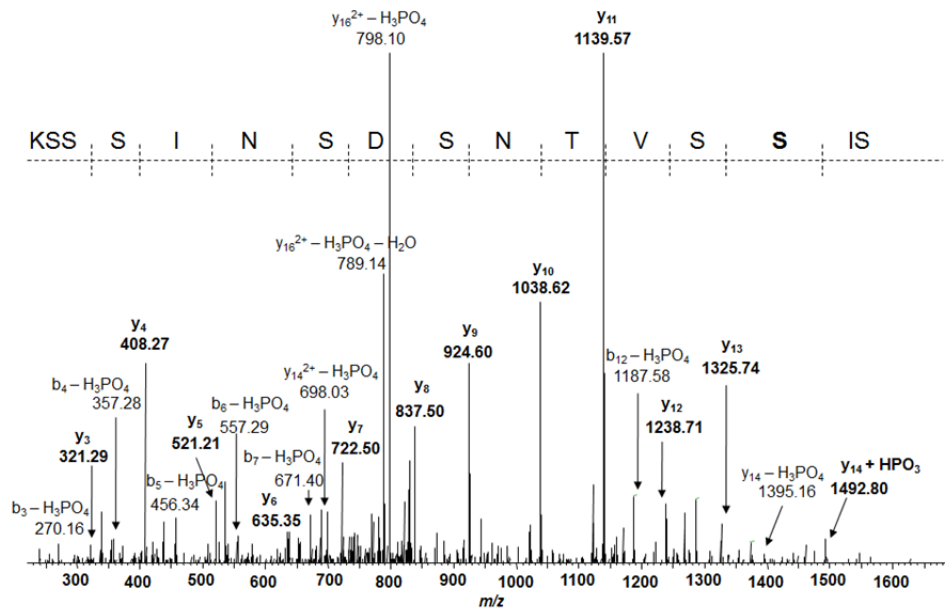


Figure S2H

307- SISSVTNpSDSNISSK -320 pSer314

$m/z_{obs} = 846.8701$ (2+)

$m/z_{theo} = 846.8698$ (2+)

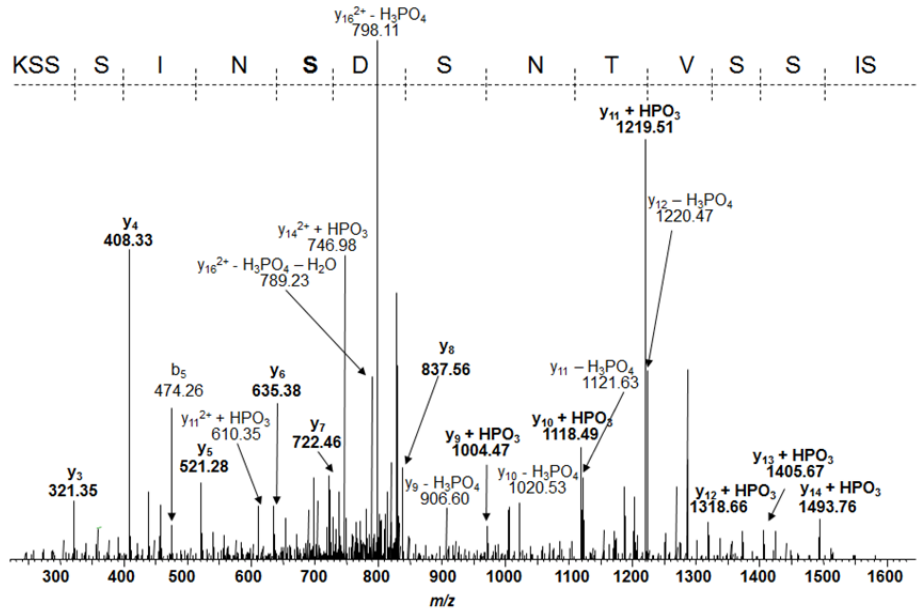


Figure S2I

329- KSSpSASAILPKPTTK -344 pSer332

$m/z_{obs} = 566.3009$ (3+)

$m/z_{theo} = 566.3013$ (3+)

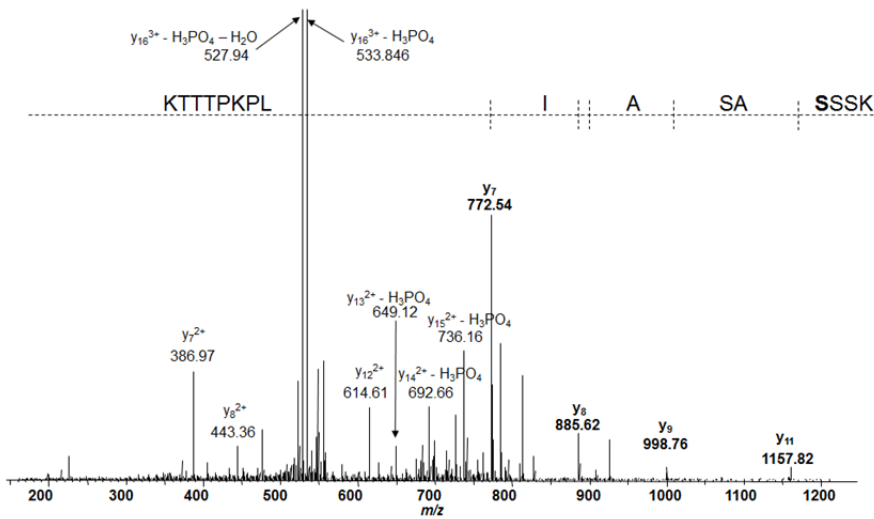


Figure II.S2 A-I. Rad53 directly phosphorylates several residues in recombinant Hpc2. (Related to Figure II.4 and Supplemental Table II.S1)

MS/MS spectra showing residues that were directly phosphorylated by Rad53 as identified by mass spectrometry of Hpc2 (residues 32-352). The top of each panel shows the peptide containing the phosphorylated residue, the experimental (m/z_{obs}) and the theoretical (m/z_{theo}) m/z ratio of each precursor peptide. In each MS/MS spectrum, the sequence from left to right is shown from the C-terminus to the N-terminus relative to that of Hpc2. The residues that are phosphorylated are shown in red. In one case, the presence of two residues shown in parentheses indicates that the MS/MS spectrum is not able to pinpoint unambiguously which residue is phosphorylated.

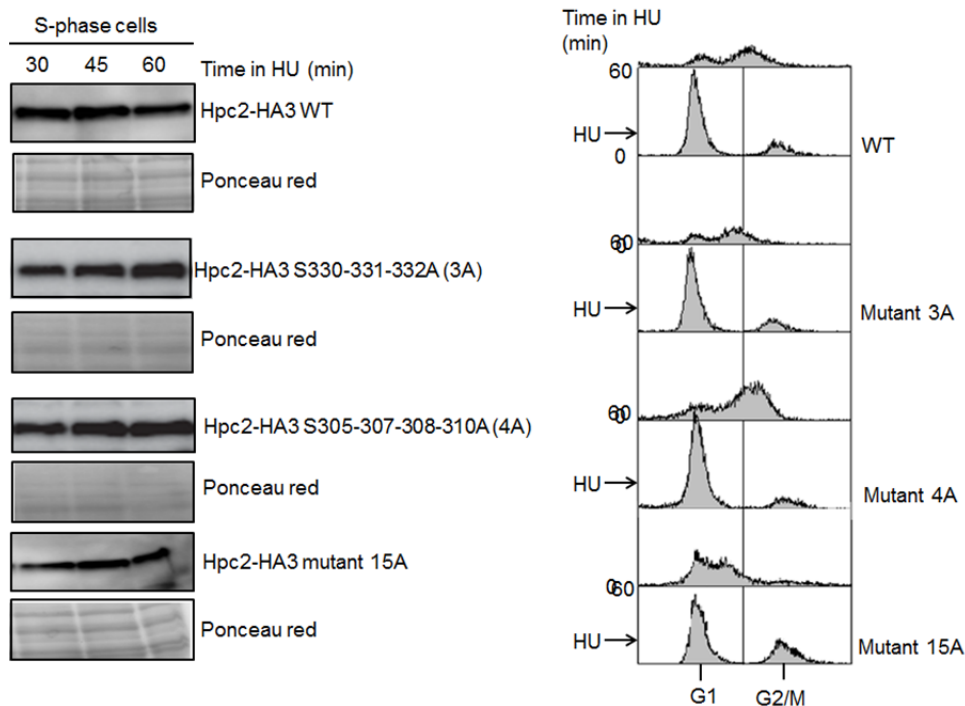


Figure II.S3. Hpc2 serine-to-alanine mutants are not destabilized in Hydroxyurea.

Hpc2 mutant cells were released from α -factor and treated with 0.2 M HU for 30, 45 and 60 min. Hpc2 serine-to-alanine mutants remain stable in HU.

II.7 Supplemental information

Yeast methods

All the yeast strains used in this study are congenic to W303-1a and are listed in Supplemental Table II.S3. Yeast cells were routinely grown at 30°C in either rich (YPD) or synthetic minimal medium lacking tryptophan to select for the pTS39b plasmid (Xu *et al.* 1992) that carries a neomycin reporter gene driven by the *HTAI* promoter. For experiments involving synchronized yeast cultures, cells were grown to a density of 1×10^7 cells/ml and α -factor was added at a concentration of 5 μ g/ml for 2h or until the cells were arrested in G1 phase of the cell cycle. The α -factor was removed by washing the cells with pre-warmed medium and cells were resuspended in pre-warmed medium to allow them to progress into S-phase. Hydroxyurea (0.2M) or methyl methane sulfonate (0.1%) were added 20 min following α -factor release, which corresponds to early S-phase as judged by FACS analysis. Cell aliquots (10ml) were harvested at 10-min intervals by the addition of sodium azide to 0.1% and centrifugation. The resulting cell pellets were frozen on dry ice and stored at -80°C for subsequent isolation of RNA. For experiments involving exponentially growing yeast cultures, cells were grown to a density of 1×10^7 cells/ml before being treated with or without HU for varying lengths of time, following which they were processed exactly as described above for synchronized cultures. The *RSC1* and *RSC9* genes were tagged at the C-terminus with a *13Myc-TRP1* cassette by a PCR based strategy (Longtine *et al.* 1998). Correctly tagged clones were identified by colony PCR and the expression of the tagged protein was verified by Western blot analysis using the 9E10 antibody. The chromosomal copies of the *HIR1*, *HIR2*, *HIR3* and *HPC2* genes were tagged with three tandem repeats of the Flag epitope using pRS304 or pRS305-based integration constructs. The sequence of each construct was verified by DNA sequencing and correctly tagged clones were identified by Western blotting with Flag antibodies. The chromosomal copy of *RAD53* was tagged with the TAP epitope using a PCR based strategy (Gavin *et al.*, 2002).

RNA isolation and northern blot analysis

Total yeast RNA was isolated from 10 ml of cells at a density of $1-2 \times 10^7$ cells/ml. RNA was extracted using the RNeasy Kit (Qiagen) according to manufacturer's instructions. Total RNA (20 μ g/lane) was resolved in a 1% agarose-formaldehyde gel (Sambrook *et al.* 1989). The gel was transferred overnight onto a Hybond-XL nylon membrane (Amersham Pharmacia) by upward capillary transfer in 20 \times SSC (1 \times SSC is 0.15M NaCl, 15mM sodium citrate). RNA was fixed to the membrane by cross-linking with 0.12J of UV irradiation using a UV Crosslinker (UVP). Membranes were prehybridized for 1h at 68°C in ExpressHyb solution (Clontech). Hybridization was performed in the same buffer at 68°C for 1-2h with [γ - 32 P] UTP labelled antisense RNA probes transcribed *in vitro* using the MAXIscript kit (Ambion) following the manufacturer's instructions. The DNA fragments used to generate the probes were derived from the 3'-untranslated region of histone genes to enable specific detection of transcripts derived from each gene. Subsequently, the membrane was washed three times with 2 \times SSC, 0.05% SDS at room temperature, followed by three washes in 0.1 \times SSC, 0.1% SDS at 50°C. Northern blots were quantitated on a phosphorimager (Molecular Dynamics).

Flow cytometry (FACS) analysis

Samples (1ml) of cultures at a density of $1-2 \times 10^7$ cells/ml were harvested by centrifugation and fixed for 1 hour by resuspending the cells in 1ml of 70% ethanol. Samples were processed for FACS analysis by washing once with 1ml of 50mM Tris-HCl pH 7.8. The cells were resuspended in 500 μ l of the same buffer containing 10 μ l of 10mg/ml ribonuclease A and incubated for 5-6 hours at 37°C. The cells were pelleted and resuspended in 500 μ l FACS buffer (200mM Tris-HCl pH7.5, 200mM NaCl, 78mM MgCl₂) containing 15 μ l 2mg/ml propidium iodide. Cell aliquots (100 μ l) were diluted in 1ml of 50mM Tris-HCl pH7.8, sonicated and analyzed by flow

cytometry using either the FACScan or FACS Canto II flow cytometers from BD Biosciences.

Immunoprecipitation

For immunoprecipitation of tagged proteins, cells were harvested from 1 liter cultures at $\sim 2 \times 10^7$ cells/ml. Whole-cell extracts (WCEs) were prepared by grinding cells in liquid nitrogen in a SPEX CertiPrep 6850 Freezer Mill in 20ml lysis buffer containing protease and phosphatase inhibitors (20mM Hepes-KOH pH 7.5, 110mM potassium acetate, 10% glycerol, 0.1% Tween-20, 1mM sodium vanadate, 50mM sodium fluoride, 50mM sodium β -glycerophosphate, 10mM sodium butyrate, 10mM 2-mercaptoethanol, 1X Roche protease inhibitor cocktail, 5 μ M MG-132). Extracts from equal amounts of cells were incubated overnight at 4°C with Flag M2 (Sigma), 9E10 or IgG sepharose (Amersham Biosciences) beads to immunoprecipitate Flag, Myc and TAP-tagged proteins respectively. The immunoprecipitated material was resolved on 4-12% Bis-Tris Criterion™ XT Pre-cast polyacrylamide gels run in XT MES buffer (Bio-Rad) and probed for the presence of Flag, Myc or TAP tagged proteins by immunoblotting.

Immunoblotting

For detection of Rad53 or Hpc2 by immunoblotting, 1.5×10^7 to 3.0×10^7 cells were harvested and frozen immediately in liquid nitrogen. Whole-cell extracts were prepared using an alkaline method (Kushnirov 2000). The extracts were analyzed in SDS-7.8% or 10% polyacrylamide gels optimized for separation of phosphorylated Rad53 or Hpc2, respectively. Rad53 polyclonal antibodies were a generous gift from Dr. John Diffley (Cancer Research UK) and were used at a 1:2000 dilution. Immunoblotting for the detection of immunoprecipitated Flag, HA, Myc or TAP tagged proteins was carried out using Flag M2 (Sigma), HA 12CA5 (Sigma), 4A6 Myc antibodies (Upstate) and peroxidase anti-peroxidase (PAP) complex (Sigma)

respectively at 1:2000 dilution. H3-C antibodies (Gunjan and Verreault, 2003) were used at 0.3 $\mu\text{g/ml}$ for the detection of H3 by immunoblotting.

Chromatin immunoprecipitation (ChIP)

Cultures were grown to a density of $1-2 \times 10^7$ cells/ml prior to the addition of 0.2M hydroxyurea (HU). Cells were fixed with 1% formaldehyde for 15 min at room temperature either before or after HU addition for 40 min, or after washing away the HU and growing the cells for a further 20 min. Glycine was added to a final concentration of 200 mM for 5 min at room temperature before harvesting the cells by centrifugation. Cells were washed twice with cold TBS (20mM Tris-HCl pH 7.4, 150mM NaCl) and once with cold FA-lysis buffer (50mM Hepes-KOH pH 7.5, 140mM NaCl, 1mM EDTA, 1% Triton X-100, 0.1% sodium deoxycholate, 1mM PMSF, 1 $\mu\text{g/ml}$ leupeptin, 1 $\mu\text{g/ml}$ pepstatin) and resuspended in 500 μl FA-lysis buffer. An equal volume of glass beads was added with 500 μl cold FA-lysis buffer and the cells were disrupted using a Thermo Smartprep bead beater (speed 5.0 for 30sec with 1min cooling intervals on ice, repeated 3 times). The tube was punctured at the bottom and the lysate collected by centrifugation into a fresh tube and diluted with cold FA-lysis buffer to a final volume of 1.5 ml. The extract was then sonicated on ice for 15 sec using a Branson Sonifier (micro tip, output power 4) and allowed to cool for 1minute. The sonication step was repeated twice. The lysate was clarified by two steps of centrifugation (5 min at 20,000xg, followed by 15 min at 20,000 x g) and an amount of extract equivalent to $1-2 \times 10^7$ cells was used for immunoprecipitation. The 9E10 mouse monoclonal antibody (1 μl at 1.2mg/ml) against the Myc epitope was incubated with the lysate (3h to overnight) at 4°C on a rotator. The reactions were clarified by centrifugation at 20,000xg for 15min at 4°C. Protein A-Sepharose beads (15 μl) pre-incubated for 15 min at 4°C in TBS buffer containing bovine serum albumin (1mg/ml) and herring testis DNA (1mg/ml) were added to the reactions and incubated on a rotator for 1h at 4°C. The beads were washed sequentially with 2 ml

FA-lysis buffer, FA500 (50mM Hepes-KOH pH 7.5, 500mM NaCl, 1mM EDTA, 1% Triton X-100, 0.1% sodium deoxycholate), LiCl wash solution (10mM Tris-HCl pH 8, 250mM lithium chloride, 1mM EDTA, 0.5% Nonidet P40, 0.5% sodium deoxycholate) and TES (10 mM Tris-HCl pH 7.5, 1 mM EDTA, 100 mM NaCl). Immunoprecipitated material was eluted twice by incubating the beads in 100 μ l elution buffer (100mM Tris-HCl pH 7.8, 400 mM NaCl, 10 mM EDTA, 1% SDS) for 10min at 37°C. To degrade proteins and reverse crosslinks, samples were first incubated with proteinase K (20 μ g) for 1h at 42°C and then at 65°C (5h to overnight). The immunoprecipitated DNA was purified using the QIAquick PCR purification kit (Qiagen) according to the manufacturer's instructions. Due to our previous efforts to ChIP the HIR complex proteins that did not work and also to increase the efficiency of cross-linking for the ChIP of Hir2-TAP in *hpc2 Δ* strain (containing the mega mutant mutation), cells were fixed with 10 mM dimethyl adipimidate (DMA, Fischer #PI-20660) in ice-cold 1x PBS containing 0.25% (v/v) dimethyl sulfoxide (DMSO) for 45 min and then were washed twice and resuspended in 1% formaldehyde in PBS for approximately 3 h at room temperature (Robyr *et al.* 2004). For immunoprecipitation of Hir2-TAP, the anti-protein A antibody coupled to magnetic beads (Sigma #P3775 and Invitrogen #14301) were incubated to the lysate overnight and then the ChIP was performed as described above.

Quantitative PCR (qPCR)

The immunoprecipitated DNA was quantitated by real-time PCR (Perkin-Elmer ABI Prism 7700 Sequence Detector System or Bio-rad iQ5 real-time PCR Detection System) using primers and probe oligonucleotides that amplify the divergent promoter regions of each histone gene pair (sequences and genomic locations are available upon request). To compensate for variations in DNA recovery, the histone promoter signals were normalized to those obtained by amplification of the *MATa* region or from an intergenic region on the chromosome I. For each DNA sample, PCR reactions were carried out in triplicate and the data presented in figure II.7

represent an average of three to four independent ChIP assays for each strain. Real-time PCR provides an estimate of the initial concentration of a given DNA target by monitoring the PCR cycle at which the exponential curve of accumulated product reaches a certain threshold. The height of the bars in figure II.7 reflects the ratio of the signal for the *HTAI* promoter over that derived from the *MATa* locus or the intergenic region of the chromosome I. That ratio was set to 1 for the control cells before HU addition.

***In vitro* purification and kinase assays of Rad53 and Hpc2**

pET28+ plasmid containing a full length RAD53-HIS6 was expressed and purified from *E. coli* ArticExpress BL21 bacteria. Hpc2 protein was expressed in a shorter form in *E. coli* starting to amino acids 32 to 352 (pET28+ HPC2-HIS6). Purification was performed using High-performance liquid chromatography (HPLC) and purified proteins were dialyzed into Kinase Buffer (25mM HEPES-NaOH pH 7.5, 10mM MgCl₂, 10mM MnCl₂, 1 mM DTT). 100 μM of cold ATP were used for mass spectrometry detection of Hpc2 phosphorylation sites in the kinase buffer or 10 mM of cold ATP plus 0.1 μCi of [γ ³²P]-ATP were used for hot *in vitro* kinase assays. The radioactive acrylamide gel was dried and assessed by autoradiography. To examine phosphorylation sites present on Hpc2, Hpc2 band on a 10% acrylamide gel were excised and/or directly trypsin digested and analyzed by LC-MS/MS using the LTQ-Orbitrap XL mass spectrometer.

In-gel trypsin digestion

Coomassie Blue stained protein bands were excised from the gel and incubated by shaking in a 50% acetonitrile (ACN) destaining solution. Proteins were then reduced with dithiothreitol (DTT) and alkylated with iodoacetamide prior to in-gel digestion with 200ng of trypsin for 4h at 37°C. The resulting peptides were extracted from the

gel using a solution containing 5% trifluoroacetic acid (TFA) and 50% ACN, dried in a Speed-Vac and redissolved in 0.2% formic acid (FA) for nano-LC-MS/MS analysis.

LC-MS/MS analysis

All MS analyses were conducted using an LTQ-Orbitrap XL hybrid mass spectrometer equipped with a nanoelectrospray ion source (Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA) and coupled to a nano-flow LC system (Eksigent, Dublin, Ireland) and a Finnigan AS autosampler (Thermo Fisher Scientific). The chromatographic separation was performed using a trapping column (4mm length, 360 μ m i.d.) and an analytical column (10cm length, 150 μ m i.d.) packed in house with 3 μ m C₁₈ particles (Jupiter 300Å, Phenomenex, Torrance, CA). Peptides were eluted using a linear gradient of 5-40% ACN containing 0.2% FA for 53 min, followed by a rapid increase to 60% ACN in 3 min. The flow rate was set to 0.6 μ L/min. Peptides were analyzed in data-dependent mode. For each high resolution MS scan, the three most abundant ions with intensity above 10,000 counts were selected for MS² sequencing by the LTQ-Orbitrap XL (60,000 full-width half-maximal resolution; acquisition range of 400-1600 *m/z*). Product ions corresponding to the loss of a phosphate group (*i.e.* a neutral loss of 98 Da) from the precursor peptide were subsequently selected for MS³ fragmentation. For all nano-LC-MS experiments, an internal mass lock (protonated (Si(CH₃)₂O)₆ with *m/z* 445.120025) or an external calibration mixture (Caffeine, MRFA and Ultramark) were used for mass calibration and provided mass accuracy within 5ppm. MS data were analyzed using the Xcalibur software (version 2.0 SR1). Peak lists were then generated using the Mascot distiller software (version 2.1.1, Matrix Science) where MS processing was performed using the LCQ_plus_zoom script. Searches of the NCBI nr database containing 3,310,354 entries (NCBI nr March 3 2006) were conducted using the Mascot search engine (version 2.1, Matrix Science, London, U.K.). The database searches were narrowed to yeast and allowed up to 2 missed cleavage sites for trypsin. The mass tolerance threshold for experimental MS precursor ions and MS² fragment ions was set to ± 0.02 and ± 0.5 Da, respectively. All

searches were conducted to allow the following variable modifications: +80 for phosphorylation (Ser, Thr or Tyr), +16 oxidation (Met), +1 for deamidation (Asn and Gln), and + 57 for carbamidomethylation (Cys). Finally, all MS² and MS³ spectra ascribed to phosphopeptides by the computer search algorithm were manually verified and validated.

Multiple reaction monitoring (MRM)

The Multiple Reaction Monitoring (MRM) assay of Hpc2 tryptic peptides was performed on a 4000 Q-Trap mass spectrometer (AB/MSD Analytical Technologies, Thornhill, ON, Canada), equipped with a Nanospray II interface. The chromatographic separation was performed using a trapping column (4 mm length, 360 µm i.d.) and an analytical column (10 cm length, 150 µm i.d.) packed in-house with 3-µm C₁₈ particles (Jupiter 300Å, Phenomenex, Torrance, CA). The flow rate was set to 0.6µL/min and peptides were eluted using a linear gradient from 5-40% ACN containing 0.2% FA for 53 min, followed by a rapid increase to 80% for 3 min. The 784.90 →735.90 MRM transition was monitored with a 25 ms dwell-time to detect the phosphorylated ³²⁸SSSASAILPKPTTTK³⁴² Hpc2 peptide in asynchronous, MMS and MMS + caffeine treated cells. The sequence of the peptide and the site of phosphorylation were confirmed by MRM by triggering an enhance product ion (EPI) scan in data-dependent mode.

II.8 Acknowledgments

We wish to thank Drs. John Diffley, Michael Grunstein, Steve Jackson, Noel Lowndes, Mary Ann Osley, Rodney Rothstein, and Yanchang Wang and Philippe Prochasson for providing strains and reagents, and Debbie Lyon for constructing the YDL74 strain. We thank Dr. David Brown for critical reading of this manuscript. A.G. was supported by a Postdoctoral Fellowship from the European Molecular Biology Organization (EMBO) during the early part of this study. This work was funded by grants from Cancer Research UK and the Canadian Institutes for Health Research (RCHP0091) to A.V., a Florida State University Council for Research and Creativity Planning Grant to J.P. and NIH grant (R15GM079678-01) to J.P. and A.G.

Chapitre III

Histone Deacetylase Inhibitors Globally Enhance H3/H4 Tail Acetylation Without Affecting H3 Lysine 56 Acetylation

Chapitre III. Histone Deacetylase Inhibitors Globally Enhance H3/H4 Tail Acetylation Without Affecting H3 Lysine 56 Acetylation

Paul Drogaris^{*}, Valérie Villeneuve^{*}, Christelle Pomiès, Eun-Hye Lee, Véronique Bourdeau, Éric Bonneil, Gerardo Ferbeyre, Alain Verreault, Pierre Thibault[#]

*** These authors contributed equally to this work**

#Corresponding authors: Pierre Thibault and Alain Verreault

This chapter corresponds to a published article in Scientific Reports

III.1 Abstract

Histone deacetylase inhibitors (HDACi) represent a promising avenue for cancer therapy. We applied mass spectrometry (MS) to determine the impact of clinically relevant HDACi on global levels of histone acetylation. Intact histone profiling revealed that the HDACi SAHA and MS-275 globally increased histone H3 and H4 acetylation in both normal diploid fibroblasts and transformed human cells. Histone H3 lysine 56 acetylation (H3K56ac) recently elicited much interest and controversy due to its potential as a diagnostic and prognostic marker for a broad diversity of cancers. Using quantitative MS, we demonstrate that H3K56ac is much less abundant than previously reported in human cells. Unexpectedly, in contrast to H3/H4 N-terminal tail acetylation, H3K56ac did not increase in response to inhibitors of each class of HDACs. In addition, we demonstrate that antibodies raised against H3K56ac peptides cross-react against H3 N-terminal tail acetylation sites that carry sequence similarity to residues flanking H3K56.

III.2 Introduction

Eukaryotic DNA is packaged into a nucleoprotein structure known as chromatin. The primary function of this structure is to compact DNA within the cell nucleus. The fundamental repeating unit of chromatin is the nucleosome core particle (NCP), which is composed of 147 base pairs of DNA wrapped nearly twice around the surface of an octamer of small basic proteins known as histones (Davey *et al.* 2002). This octamer is formed from two molecules each of four types of core histones: H2A, H2B, H3, and H4. Although the structure of chromatin is inherently dynamic, it also considerably restricts access to genetic information (Luger 2006). Cells have evolved mechanisms to control access to DNA packaged into chromatin. These include ATP-driven nucleosome remodeling machines, histone variants and histone post-translational modifications (PTMs) (Kouzarides 2007). Each core histone consists of a conformationally flexible N-terminal extension, commonly referred to as “histone tail”, and a globular domain that mediates protein-protein interactions and DNA binding within NCPs (Davey *et al.* 2002). The N-terminal tails of core histones protrude beyond the DNA gyres of NCPs, and are therefore readily accessible to histone-modifying enzymes (Davey *et al.* 2002). These tail domains contain multiple residues that are covalently modified by a wide diversity of PTMs (Kouzarides 2007). Advances in mass spectrometry (MS) have also uncovered a number of PTMs in the globular domains of core histones (van Leeuwen *et al.* 2002, Masumoto *et al.* 2005, Ye *et al.* 2005). Histone PTMs occur either alone or in combination, leading to the notion of a “histone code”, a generic term used to describe how specific patterns of histone PTMs influence the binding of effector proteins to NCPs and, as a result, control a variety of processes that require access to DNA (Strahl and Allis 2000).

One of the most intensively studied histone PTMs is the acetylation of lysine residues (Kouzarides 2007). The addition and removal of an acetyl group on lysine residues, respectively mediated by histone acetyltransferases (HATs) and deacetylases (HDACs), is a highly dynamic and regulated process that contributes to

transcriptional activation and silencing (Morales *et al.* 2001). In humans, there are 18 known HDAC enzymes that are subdivided into four classes (Bolden *et al.* 2006). The seminal discovery that the histone deacetylase inhibitor (HDACi) trichostatin A (TSA) triggered cell cycle arrest and differentiation of Friend erythroleukaemic cells promoted numerous subsequent studies on various types of cancer cells (Yoshida *et al.* 1990). In diseases such as cancer, HDACs contribute to oncogenesis via at least two distinct mechanisms: overexpression of individual HDACs (Halkidou *et al.* 2004), and aberrant recruitment of HDACs to specific chromosomal loci by oncogenic fusion proteins (*e.g.* PML-RAR α) (Minucci *et al.* 2001). These perturbations of HDAC function often lead to silencing of tumor suppressor genes. Changes in the abundance of specific histone PTMs also occur in cancer cells. For example, a study of numerous cancer cell lines, normal tissues and primary tumors revealed that a global decrease in H4K16 acetylation and H4K20 methylation is a recurring feature of many types of cancer cells (Fraga *et al.* 2005).

The involvement of HDACs in cancer has raised hope that these enzymes may represent valuable targets in drug discovery programs. Recent clinical trials demonstrated that, at least for hematological cancers (Lee *et al.* 2008, Prince *et al.* 2009, Stimson *et al.* 2009), small molecules that inhibit HDACs can be effective pharmacological agents, either when administered alone or in combination with other drugs (Bots and Johnstone 2009). Through their ability to influence gene expression, HDACi exhibit a number of anti-proliferative effects, such as cell cycle arrest, differentiation, angiogenesis inhibition and apoptosis (Bolden *et al.* 2006, Dokmanovic *et al.* 2007). A significant number of HDACi, such as suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA, also known as vorinostat or *Zolinza*), entinostat (MS-275), romidepsin (*Istodax*), and belinostat (PXD-101) are at various stages of drug development. At present, only SAHA (Mann *et al.* 2007) and romidepsin (Campas-Moya 2009) have been approved by the US food and drug administration for treatment of cutaneous T-cell lymphoma. HDACi such as SAHA are non-selective

(Beckers *et al.* 2007). There is a growing debate over the use of HDACi that cause non-specific inhibition of several distinct HDACs versus development of HDACi that would target specific classes of enzymes or even perhaps single enzyme. In addition to histones, HDACs deacetylate many important protein substrates, such as transcription regulators (*e.g.* p53, Rb, E2F1 and nuclear hormone receptors) (Dokmanovic *et al.* 2007). Thus, inhibiting multiple HDACs could be cytotoxic to normal cells and lead to undesirable side effects. On the other hand, it can be argued that non-selective HDACi are effective at killing cancer cells precisely because they interfere with the deacetylation of multiple substrates. Currently, it is not known whether inhibition of histone deacetylation, as opposed to other protein substrates, plays a major role in the anti-neoplastic effects of non-selective HDACi. As a first step to address these difficult questions, it is important to determine to what extent HDACi impair histone deacetylation in normal and cancer cells.

The ability to determine stoichiometric changes in histone acetylation elicited by HDACi is of paramount importance to identify their enzyme targets and therapeutically relevant protein substrates. Moreover, a better understanding of HDACi-induced changes in the abundance of histone acetylation at specific lysine residues could facilitate biomarker discovery and monitoring of the therapeutic effects of HDACi (Stimson and La Thangue 2009). Due to its sensitivity, selectivity and wide dynamic range, mass spectrometry (MS) has become the method of choice to detect and establish the stoichiometry of histone PTMs. Recent applications of MS also enabled the identification of histone modifications from precise mass measurements on intact protein ions and from on-line tandem MS spectra of the precursor ions (Durbin *et al.* 2010, Siuti and Kelleher 2010). In this report, we conducted a comprehensive label-free quantitative proteomics study to profile histone modifications in normal and cancer cell lines treated with different HDACi. Our experimental strategy included a two pronged-approach that we previously developed and validated to identify histone PTMs whose abundance changes between wild-type

and HAT mutant yeast strains (Drogaris *et al.* 2008). Global changes in histone modifications are first determined from the mass profiles of intact histones. In a second step, the modification sites and their respective stoichiometric changes are established by a combination of propionylation, trypsin digestion and LC-MS/MS analyses. Bioinformatics tools are exploited to rapidly sift through vast amounts of raw MS data. In this study, we also designed two highly quantitative assays to accurately determine the degree of modification of specific histone lysine residues, even when the stoichiometry of acetylation is very low.

III.3 Experimental procedures

Immunoblotting

Histone proteins were run through SDS-polyacrylamide gels and transferred onto PVDF membranes. After transfer, the presence of equal amounts of core histones was assessed using either Ponceau S staining or by immunoblotting using an antibody against non-modified histone H4. The membranes were then probed with primary antibodies raised against H3K56ac peptides (Active Motif mouse monoclonal antibody 61061, Upstate/Millipore rabbit polyclonal antibody 07-677 or Epitomics rabbit monoclonal antibody 2134-1) overnight at 4°C. After a 12-14h incubation with primary antibodies, blots were washed extensively in Tris-buffered saline (25mM Tris-HCl pH 8.0, 137mM NaCl, 3mM KCl). After incubation with secondary antibodies (anti-rabbit IgG coupled to horseradish peroxidase) for one hour at room temperature, the blots were washed extensively in Tris-buffered saline (25 mM Tris-HCl pH 8.0, 137 mM NaCl, 3 mM KCl) containing 0.1% (w/v) Tween-20, and antibody binding was detected by enhanced chemiluminescence (GE Healthcare). Synthetic peptides were mixed at a 1000:1 molar ratio with purified antibodies to determine whether they blocked the ability of antibodies to detect acetylated histones.

Sample preparation and protein digestion

The total protein content of histone-enriched acid extracts was measured with the Micro-BCA assay. Approximately 15 μg of starting material was separated using an Agilent 1100 HPLC system equipped with a micro-fraction collector. Separations were performed on a Jupiter microbore C_{18} column (3 μm , 300 \AA ; 150 x 1 mm i.d.) with a solvent system consisting of 0.1% TFA in water (v/v) (solvent A), and 0.1% TFA in acetonitrile (v/v) (solvent B). Gradient elution was performed from 5 to 70% B in 60 min at 15 $\mu\text{L}/\text{min}$. Fractions were collected in a 96-well plate at 20 second intervals and fractions representing individual histone peaks were pooled together. For the targeted analysis of H3K56ac, approximately 50 μg of starting material was separated using an Agilent 1200 HPLC system equipped with a fraction collector. Separations were performed on an ACE standard bore C_8 column (5 μm , 300 \AA ; 150 x 4.6 mm i.d.) at 0.7 mL/min. Histone H3 fractions were collected in 2 mL Eppendorf tubes at 1 minute intervals. Multiple fractions were pooled together as described above. Histones were prepared and digested as previously described (Drogaris *et al.* 2008). LC fractions were dried in a Speed-Vac evaporator and resuspended in 0.1 M ammonium bicarbonate buffer (without pH adjustment). Intact histones were derivatized in a 1:1 volume ratio with a propionic anhydride reagent. After a 30 minute derivatization period at room temperature, samples were evaporated a second time, resuspended in 0.1 M ammonium bicarbonate, and digested overnight at 37° C using 1 μg of trypsin. Samples were acidified with 5% TFA in water (v/v) prior to LC-MS analysis. Under our conditions, propionylation proceeded nearly to completion, as judged by negligible trypsin cleavage at non-propionylated lysine residues, which we verified by MS. Near complete propionylation of non-modified lysine residues is important to determine the accurate stoichiometry of histone acetylation because trypsin would otherwise cleave after non-modified lysines. This would obviously lead to an over-estimation of the fraction of histone molecules that are acetylated at a given site.

Intact histone profiling

Intact histone analysis was performed on an Agilent 6520 Q-TOF mass spectrometer equipped with a nanoelectrospray interface. The instrument was operated in positive ion mode (2800 V at interface) and scanned from m/z 400 to 1600. Equivalent amounts of histone acid extracts were diluted down to a concentration of 100 ng/ μ L with the initial LC-MS mobile phase (see below). An aliquot was injected onto an in-house packed capillary C_{18} trapping column (4 mm x 360 μ m I.D.) for 3 min at 10 μ L/min using a loading solvent (95:5 water:acetonitrile containing 0.2% formic acid (v/v)). Histones were eluted onto the C_{18} analytical column (100 mm x 150 μ m i.d.) using 0.2% formic acid in water (v/v) (solvent A), and 0.2% formic acid in acetonitrile (v/v) (solvent B). Gradient elution was performed from 5 to 90% B in 60 min at 600 nL/min. Intact histone mass profiles were generated from acquired mass spectra using the *MaxEnt1* deconvolution algorithm of the Mass Hunter software.

Ion profiling and peptide sequencing by LC-MS/MS

LC-MS/MS analyses were performed using an LTQ-Orbitrap XL mass spectrometer (Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA) equipped with a nanoelectrospray interface. Tryptic digests were injected in triplicate using an Eksigent nano 2D-LC system. The same columns and solvent systems were used as described above in the intact mass profiling section. The instrument was operated in positive ion mode and scanned from m/z 300 to 1600, resolution set to 60 000, with a target value of 1.0×10^6 . For tandem MS/MS sequencing, the LTQ ion trap was scanned from m/z 50 to 2000, with a target value of 1.0×10^4 . One full survey scan in the Orbitrap was followed by data dependant MS/MS acquisition on the three most intense ions. A decision tree based on peptide m/z ratio and charge state was used to trigger either CID or ETD fragmentation (Swaney *et al.* 2008). A normalized collision energy of 35 was used to generate fragment ions in the LTQ by CID, while a 100 ms activation time was used

for ETD ion-ion reactions. All MS/MS spectra of modified histone peptides are provided as supplementary Figures.

All raw data files (.raw) from triplicate injections on the LTQ-Orbitrap XL mass spectrometer were converted into peptide maps using Mass Sense (version 2.5), an in-house peptide detection software used to identify peptides based on m/z values, retention time, abundance, and charge state. An intensity threshold of 10 000 counts was set as cutoff for precursor ion peak detection. Segmentation analysis was performed by clustering the peptide ions identified in each treatment condition based on their respective m/z ratio, charge, and LC retention time using an m/z tolerance of ± 0.02 Th and a time difference of 1 min. Normalization of LC retention time is then performed on the initial peptide cluster list using a dynamic and nonlinear correction. Once clustered, all peptide intensities were averaged and a mean ratio was calculated to generate a correction factor used to normalize for changes in abundance and differences in amount of peptide loaded. Normalized intensities are then used to generate a volcano plot for differential histone PTM expression profiling. Raw data files were converted to Mascot generic files (.mgf) using *Mascot Distiller* (version 2.2.1) and *Mascot Daemon* (version 2.2.2). A mass tolerance of 0.02 Th was used for the precursor ions, and 0.5 Th for the fragment ions. A maximum of 9 missed cleavages was permitted during the Mascot searches. The following variable modifications were included in the search parameters: acetylation, methylation + propionylation, dimethylation, and trimethylation, and propionylation of lysine residues, methylation of arginine residues, phosphorylation of serine, threonine and tyrosine residues, and oxidation of methionine residues. Manual MS/MS spectra verification was performed on each modified peptide with Mascot scores greater than 20 to confirm the sequence assignment. Mascot searches were downloaded from the Mascot server into an Excel spreadsheet, from which redundant and low scoring peptides were removed. All MS/MS spectra corresponding to modified histone tryptic peptides are provided as supplementary information.

Targeted analysis of H3K56ac by multiple reaction monitoring and absolute quantitation

Stock solutions at 1 mg/mL in deionized water were prepared for two K56-acetylated synthetic peptides: a peptide containing only [^{12}C] and a peptide where a leucine was [^{13}C , ^{15}N]-labeled (see below). Unmodified yeast histone H3 was expressed in *E. coli*, purified as described (Dyer *et al.* 2004), and resuspended in 0.1 M ammonium bicarbonate buffer. Approximately 3 μg of recombinant yeast histone H3 was propionylated, digested, and spiked with increasing amounts of synthetic human H3K56ac peptide (YQK(ac)STELLIR) ranging from 5 to 1000 pg/mL. To each solution, a constant amount of the isotopically labeled internal standard (IS) peptide (YQK(ac)STELLI*R, wherein I* is a [$^{13}\text{C}_6^{15}\text{N}_1$]-labeled isoleucine), was added to obtain a final concentration of 100 pg/mL IS in each vial. A 20- μL aliquot of each mixture was injected onto the LTQ-Orbitrap XL mass spectrometer, and analyzed using the same parameters as described in the LC-MS/MS analysis section.

A multiple reaction monitoring (MRM) method was designed to detect and quantify the human H3K56ac tryptic peptide using an AB Sciex 4000 Q-trap hybrid triple quadrupole-linear ion trap mass spectrometer equipped with a Nanospray II interface. Working solutions of human K56ac peptide and its labeled analogue were prepared at a concentration of 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ in 50:50 water:methanol with 0.2% formic acid (v/v/v) for nanoelectrospray infusion. Source parameters were optimized by constant infusion of the working solutions at 600 nL/min. The electrospray voltage was set to 3800V, with a declustering potential of 120V, and an optimized collision energy of 32V. The four most intense ions were chosen to build MRM transitions within the Analyst software. All MRM transitions used in this study are provided in the Supplementary Methods. Both H3K56ac and its non-modified counterpart (H3K56pr) were monitored in parallel; another H3 tryptic peptide (YRPGTVALR) was also monitored to normalize for the amount of peptide loaded and fluctuations in the electrospray response.

I.4 Results

Cell viability and cell cycle progression in response to HDACi

HDACi can trigger apoptosis or cell cycle arrest in transformed cell lines (Bolden *et al.* 2006, Dokmanovic *et al.* 2007). Recent studies performed on leukemic cell lines indicated that TSA globally increased H4 acetylation, an observation that has been correlated with the induction of apoptosis *in vitro* and *in vivo* (Johnstone 2002, Ninios *et al.* 2010). However, we wanted to analyze changes in histone acetylation under conditions where HDACi-treated cells did not lose viability or cease to proliferate. We felt that the latter was important because newly synthesized histones H3 and H4 are acetylated at several lysine residues and incorporated into chromatin throughout the genome during S-phase (Sobel *et al.* 1995, Verreault *et al.* 1996, Benson *et al.* 2006, Loyola *et al.* 2006). Because new H3/H4 molecules are very abundant in proliferating cells (50% of canonical histones present in G2 cells have been newly synthesized during S phase), they likely make a significant contribution to global levels of acetylation. Accordingly, when their deacetylation is blocked by HDACi, the acetylation of new histones would ultimately represent a significant fraction of global acetylation levels.

We first examined whether HDACi treatment caused cell cycle arrest using propidium iodide staining of DNA and flow cytometry (FACS). Asynchronously growing K562 (human erythroleukemic) cells exhibit three distinct levels of propidium iodide fluorescence intensity, corresponding to DNA contents typical of cells in G1, S, and G2/M phase (Figure III.1a). From the relative proportion of the peaks, we found that no more than 20 % of control cells (*i.e.* cells that were not treated with HDACi) were in S-phase. No significant change in the FACS profile was observed for K562 cells exposed to 1 μ M MS-275 or SAHA (data not shown) for a period of up to 24h (Figure III.1a). Thus, at this concentration, these two HDACi did not trigger any obvious cell cycle arrest. Consistent with this, K562 cell numbers

doubled during a 24h period of exposure to either 1 μ M MS-275 or 1 μ M SAHA (data not shown). Cellular viability and energy status were monitored using alamar blue, a non-fluorescent chemical that is converted into fluorescent resorufin upon metabolic reduction (Anoopkumar-Dukie *et al.* 2005). Control cells and cells treated with either 1 μ M MS-275 or 1 μ M SAHA for 48 to 72h showed no major decrease in viability or energy status (Figure III.1b and Supplementary Figures III.S4). Thus, at the time when histones were extracted for MS analysis (24h), neither MS-275 nor SAHA had caused appreciable proliferation arrest or lethality in K562 cells. Our results are consistent with the fact that the same concentrations of MS-275 or SAHA were not cytotoxic to several other human cancer cell types (Beckers *et al.* 2007). Normal human diploid fibroblasts proliferated more slowly than K562 cells. IMR90 and WI38 cells had doubling times of 48 and 72h, respectively (Supplementary Figures III.S1). However, no decrease in cell viability was observed when SAHA or MS-275 was added every 24h for up to 72 hours (Supplementary Figures III.3-4).

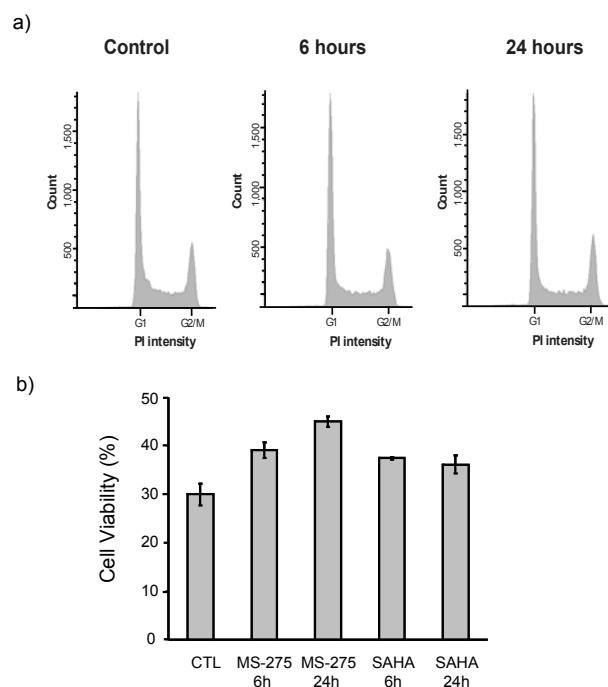


Figure III.1 Cell cycle distribution and viability of K562 cells are not affected by treatment with MS-275 or SAHA. (a) Propidium iodide (PI) staining of DNA detected by flow cytometry of K562 cells treated for 6 or 24 hours with 1 μ M of the class I HDAC inhibitor MS-275. (b) Viability of K562 cells after continuous exposure to either 1 μ M SAHA or 1 μ M MS-275 (dissolved in DMSO) for 6 or 24 hours. The y-axis reflects the degree of reduction of alamar blue by live cells monitored using fluorescence emission (see Experimental Section). Dead cells cannot reduce alamar blue. Error bars indicate three independent alamar blue assays performed with each cell sample. CTL: Control with DMSO only.

Global histone acetylation probed by intact mass profiling

We first examined the changes in the molecular mass distribution of intact histones following HDACi treatment using LC-MS on an Agilent 6520 Q-TOF mass spectrometer. In each case, a total of 500 ng of acid extracts enriched in histones were injected onto the LC-MS system. The total ion chromatogram (TIC) of histones from K562 cells that were not treated with HDACi shows that core histones H4, H2B, H2A and H3 eluted successively between 50 and 65 min under our chromatographic conditions (Supplementary Figure III.5). For convenience, mass spectra of core histones were transformed into reconstructed molecular mass profiles and the deconvoluted spectra obtained from extracts of cells treated with HDACi for 0, 6 or 24h were overlaid for comparison (Figures III.2a and III.2b). The most significant changes in the intact mass profiles were observed for histones H3 and H4, rather than H2A or H2B (Figures III.2a and III.2b). In eukaryotes, the initiator methionine is removed from the four major types of core histones: H2A, H2B, H3 and H4 (Song *et al.* 2003). Unlike H2A, H2B and H3, which exist as multiple sequence variants, there is a single H4 protein encoded by several genes (Marzluff *et al.* 2002). Essentially all H4 molecules are acetylated on their N-terminal amino groups (Song *et al.* 2003). The N-terminally acetylated form of H4 is observed at 11278 Da ($M_{\text{calc.}}$: 11278.2 Da), along with peaks at 11306 Da (+28 Da, dimethylation) and up to three additional acetylated forms at 11348, 11390, and 11432 Da. All these H4 peaks were detected

in both normal and transformed cells (Figures III.2 and Supplementary Figure III.S4). A rapid increase in mono-, di- and tri-acetylation was observed as early as 6h after addition of SAHA to K562 cells. Similar changes in acetylation patterns were observed in K562 cells treated with MS-275, although the more highly acetylated forms of H4 were only apparent after a 24h exposure. Unlike histone H2A and H4, virtually all the H3 molecules lack acetylation of the N-terminal amino group (Das *et al.* 2009). In rapidly proliferating cells, the replication-coupled histone H3 variants (H3.1 and H3.2) are more abundant than the replication-independent H3.3 protein (Orsi *et al.* 2009). In K562 and normal diploid fibroblasts, the unmodified form of H3.2 ($M_{\text{calc.}}$: 15256.8 Da) was not detected, but that of H3.1 ($M_{\text{calc.}}$: 15272.9 Da) was observed in low abundance at 15273 Da (Figures III.2 and Supplementary Figure III.S4). The intact mass profile of H3.1 revealed a heterogeneous distribution of molecular species with incremental shifts of +14 and +42 Da, corresponding to multiple forms of mono-methylation, acetylation and/or tri-methylation. Treatment of K562 cells with SAHA or MS-275 caused an overall shift to more highly acetylated forms. However, as observed for H4, the most highly acetylated forms of H3 accumulated more rapidly with SAHA (6h) than with MS-275 (24h). Based on intact mass profiling, both SAHA and MS-275 predominantly increased the acetylation of H3 and H4, whereas acetylation of H2A and H2B was affected to a much lesser extent.

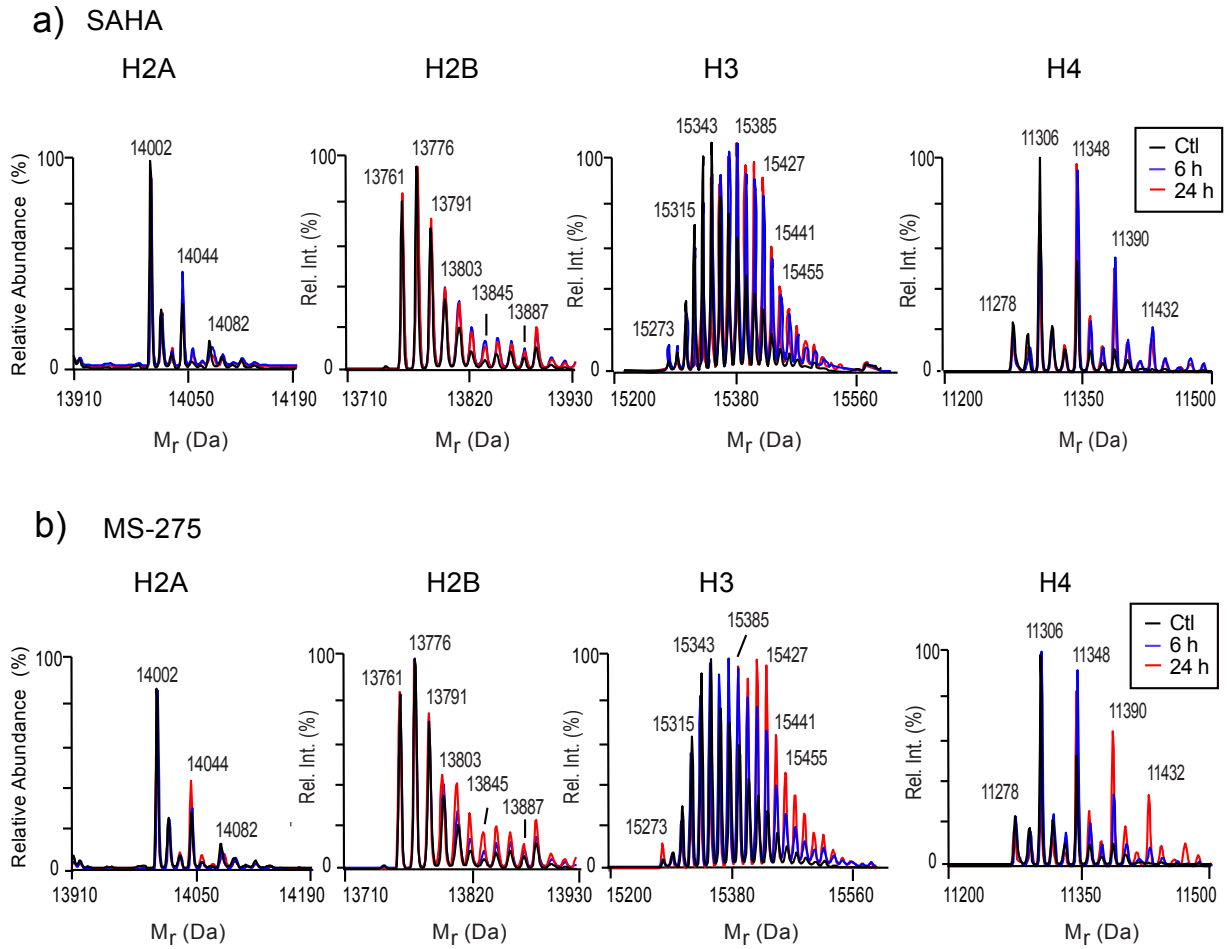


Figure III.2 LC-MS analyses of intact histones derived from transformed cells. Intact histone profiles from K562 cells treated with SAHA (a) or MS-275 (b). Color traces indicate histones purified from control cells (black) or cells treated for 6h (blue) or 24h (red) with either 1 μ M SAHA or 1 μ M MS-275 (both dissolved in DMSO). Ctl: Control cells were treated with DMSO only.

To determine whether HDACi had similar effects on normal cells, we treated human diploid fibroblasts (IMR90 and WI-38 cells) with the same concentrations of SAHA or MS-275 that were used for K562 cells. A major fraction of histone acetylation likely occurs in new histone molecules that are synthesized during S-phase. Therefore, to ensure that normal and transformed cells went through a single round of

S-phase in the presence of HDACi, it was necessary to treat IMR90 (48 h) and WI-38 (72 h) cells for longer times than K562 cells (24h). This is because normal cells proliferate more slowly than K562 cells (Supplementary Figure III.1). As observed with the K562 cell line, the viability of IMR90 or WI-38 cells was not affected by HDACi concentrations of up to at least 1 μ M (Supplementary Figures III.S3 and III.S4). The intact mass profiles of histones derived from HDACi-treated IMR90 and WI-38 cells showed global increases in the acetylation patterns of H3 and H4 (Supplementary Figure III.S5 and data not shown). In addition, over a range of concentrations where cells remained fully viable (from 0.125 μ M up to 1 μ M SAHA or 1 μ M MS-275), both HDACi caused global increases in H3 and H4 acetylation that were comparable in normal cells and transformed cells (data not shown).

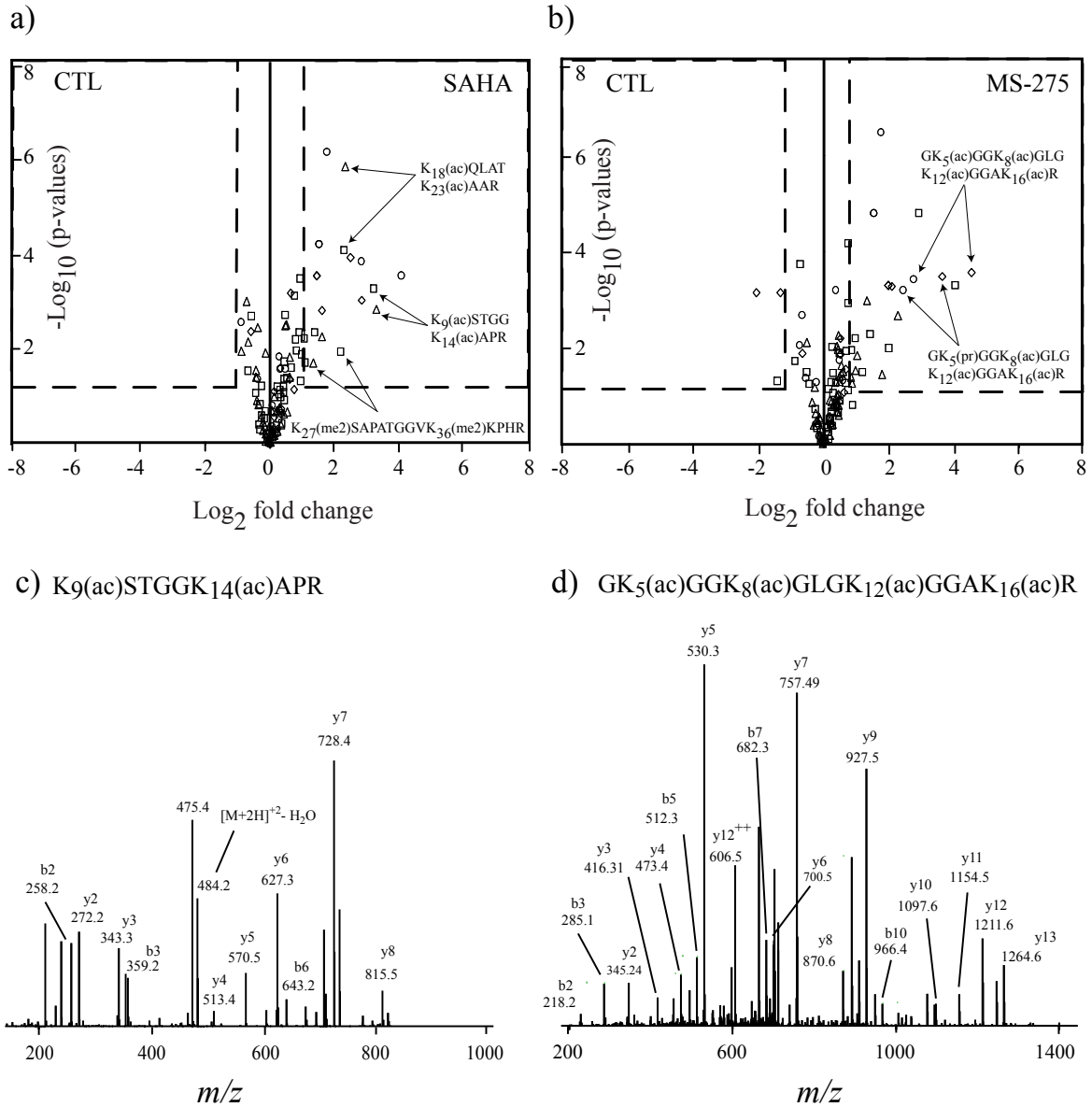


Figure III.3 Histone H3 and H4 peptide ion intensity profiling using volcano plots.

K562 cells were either left untreated (CTL) or treated with either 1 μ M SAHA **(a)** or 1 μ M MS-275 **(b)**. Arrows show examples of modified histone peptides whose abundance is significantly affected by HDACi. Tandem MS sequencing of an N-terminal histone H3 peptide **(c)**, and an N-terminal histone H4 peptide **(d)**, revealed acetylation sites that increased in abundance in response to HDACi treatment.

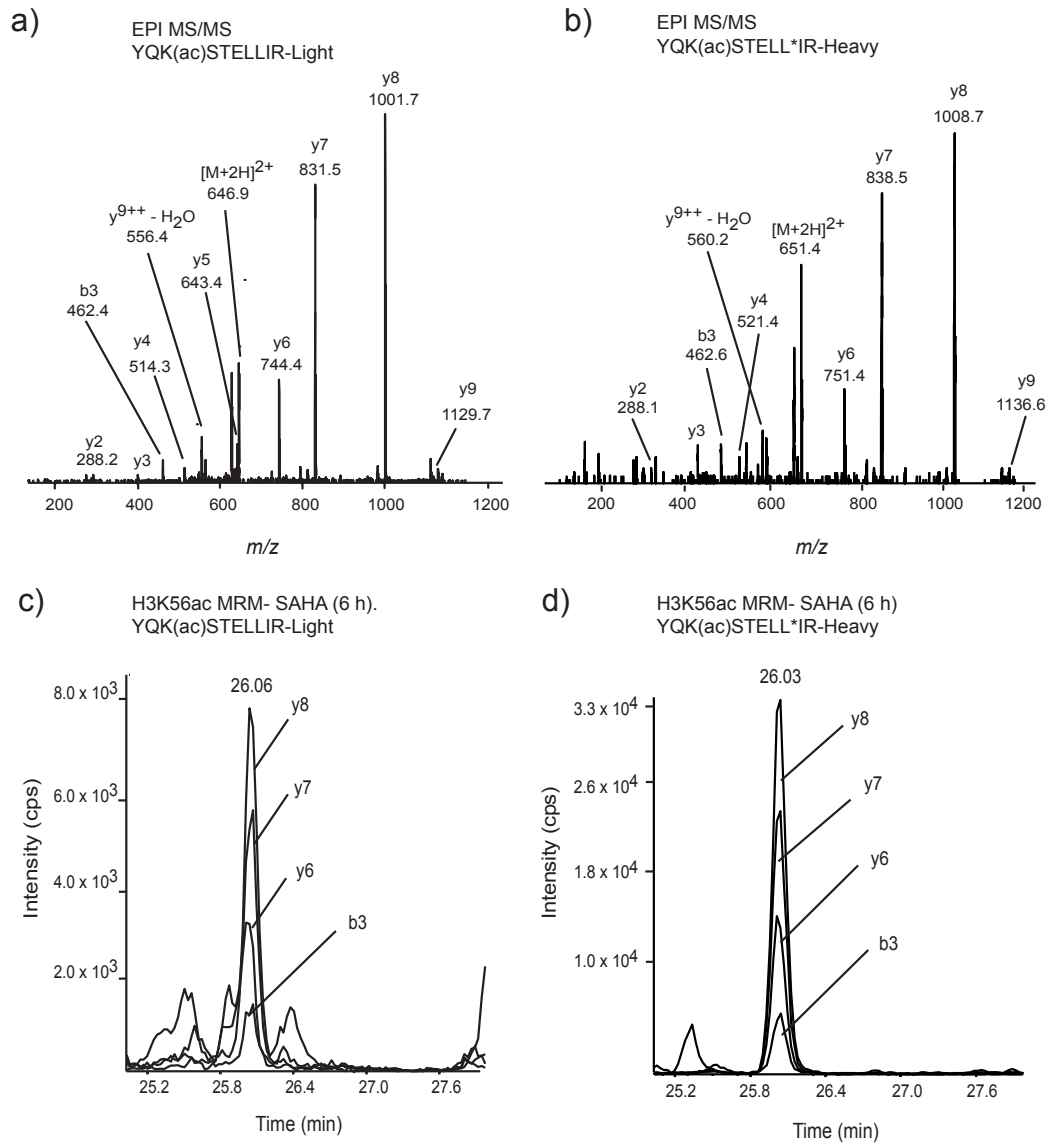


Figure III.4 Identification and quantitation of H3K56ac from K562 cells using targeted MRM. Tandem MS spectra of the light (a) and heavy (b) YQK₅₆(ac)STELLIR peptide standards at 10 μg/mL using enhanced product ion (EPI) scan. LC-MS/MS analysis (MRM) of the native H3K56ac peptide (c) and the [¹³C₆¹⁵N₁-isoleucine]-labeled YQK₅₆(ac)STELLI*R internal peptide standard (d) from a digest of histones isolated from K562 cells treated with SAHA for 6h.

Mapping modification sites by propionylation, tryptic digestion and LC-MS/MS

To determine the degree of acetylation of specific lysine residues following HDACi treatment, we purified individual histones by reversed-phase HPLC and propionylated free lysine residues prior to tryptic digestion and LC-MS/MS analyses (Drogaris *et al.* 2008). The amount of protein in acid extracts containing histones was quantitated using the Micro-BCA assay, and a total of 15 μ g was separated by HPLC to isolate individual histones. A typical chromatographic separation of histone extracts from K562 control cells resulted in near baseline separation of the four major core histones (Supplementary Figures III.S6-S7). We focused primarily on the identification of modification sites on H3 and H4, since these core histones showed the most significant global changes upon treatment with either SAHA or MS-275. H3 and H4 histones from all cells and HDACi conditions were derivatized with propionic anhydride, digested with trypsin, and analyzed by LC-MS/MS on an LTQ-Orbitrap XL. Internal calibration using the polysiloxane ion at m/z 445.120029 (protonated $(\text{Si}(\text{CH}_3)_2\text{O})_6$) provided m/z measurements within 10 ppm of the theoretical mass and facilitated unambiguous identification of modifications with closely related masses (e.g. acetylation versus tri-methylation).

The injection of tryptic digests of individual histones, rather than a complex acid extract, maximized the number of histone peptides detected and sequenced. This approach resulted in the identification of a multitude of tryptic peptides including histones H3 and H4 peptides that originally contained free or acetylated lysine residues *in vivo*. Maps representing the properties of all peptide ions (e.g. m/z , charge, LC retention time, peak intensity) were obtained from each raw LC-MS data file and aligned across replicates and HDACi treatment conditions to assess changes in abundance of each identified peptide ion. A list of all identified peptides and their abundance is presented in Supplementary Tables III.1 to 10. The relative standard deviation observed for peptide ion intensities detected in all three replicate LC-MS/MS analyses varied between 17 and 24 %, and was consistent with the

reproducibility attained by other quantitative proteomics approaches (Drogaris *et al.* 2008, Falick *et al.* 2011). For all identified H3 and H4 tryptic peptides, the statistical significance and fold change in abundance caused by either SAHA or MS-275 treatment is depicted in volcano plots (Figures III.3a and III.3b). The fold change was determined by calculating the abundance ratio of the same peptide in histones from control and HDACi-treated cells. A large proportion (~90% of all identified peptides) were unaffected by treatment with either SAHA or MS-275. These are clustered near the origin of the volcano plots (p-values > 0.05, fold change < 2). Two quadrants are delineated by dashed boxes in the volcano plots. These contain peptides showing a statistically significant fold change in either control or HDACi-treated cells for triplicate technical measurements (p-values < 0.05, fold change > 2). MS/MS sequencing with either CID or ETD fragmentation revealed that all the histone H3 residues that increased in acetylation following HDACi treatment were located within the first 36 residues of H3. Most notably, H3 K9, K14, K18 and K23 were primary sites of hyperacetylation upon treatment with either SAHA or MS-275 (Supplementary tables 3.1-3.4 and 3.9). For example, Figure III.3c shows the CID MS/MS spectrum of precursor peptide m/z 493.272+, corresponding to the tryptic peptide K₉(ac)STGGK₁₄(ac)APR, which is highlighted by arrows in Figure III.3a. This peptide showed a 5- to 17-fold increase in abundance upon SAHA or MS-275 treatment. Unexpectedly, the dimethylated tryptic peptide K₂₇(me₂)SAPATGGVK₃₆(me₂)K₃₇(pr)PHR identified by ETD fragmentation increased approximately 2- to 4-fold in abundance under the same conditions (Figure III.3a). The physiological importance of this finding is unclear, but our result nonetheless indicates that HDACi can also increase the abundance of histone lysine methylation. The combined use of CID and ETD fragmentation facilitated the localization of modification sites and enabled the identification of 41 differentially modified histone H3 peptides following addition of SAHA or MS-275 to asynchronously growing K562 cells. The use of decision tree driven MS/MS sequencing was used to maximize protein sequence coverage and identify any peptides that might have been missed if only one fragmentation mode had been used

(Swaney *et al.* 2008). The majority of peptide ions (70%) were identified using CID as doubly charged species, whereas ETD detected 30 % of ions as triply or more highly charged species.

Volcano plots were also generated for histone H4 tryptic peptides to identify residues showing the most significant changes in acetylation after SAHA (Figure III.3a) or MS-275 treatment (Figure III.3b). Following propionylation, tryptic digestion of H4 yielded an N-terminal 14-amino acid peptide (from residues 4 to 17) with four lysine residues (K5, K8, K12, and K16). This 14-residue peptide was detected in multiple forms corresponding to different modification patterns. As observed for H3, amino acids located within the N-terminal tail of H4 were the most prominent targets of acetylation. Upon HDACi treatment, we observed a gradual increase in the di- (K8, K12 or K12, Kac16 or K8, K16), tri- (K8, K12, K16) and tetra-acetylated (K5, K8, K12, K16) forms with the fully acetylated peptide clearly dominating after exposure to MS-275 (7- and 20-fold increase at 6h and 24h, respectively). The mono-acetylated (K16 or K12) forms did not show a significant change in abundance after exposure to any HDACi (Supplementary tables 3.5-3.8 and 3.10). Figure III.3d shows the MS/MS spectrum for the tetra-acetylated tryptic peptide. Careful examination of the fold changes in acetylation triggered by SAHA and MS-275 revealed interesting differences between these two inhibitors. Indeed, treatment with 1 μ M SAHA yielded a 17-fold increase in the tetra-acetylated H4 tail peptide at 6h with a subsequent reduction to 7-fold at 24h, suggesting a limited long-term inhibitory activity of SAHA compared with MS-275. The fact that MS-275 caused a more robust long-term hyper-acetylation than SAHA was also obvious from the intact mass profiles of H4 (Figures III.2a and III.2b).

Abundance of H3K56ac measured by targeted MRM and absolute quantification

Our profiling of tryptic peptides by LC-MS/MS confirmed that lysine residues located within the N-terminal tails of H3 and H4 were the most prominent acetylation sites following HDACi treatment. Indeed, we observed very few acetylated tryptic peptides within the globular domains of H3 and H4. This prompted us to determine the stoichiometry of acetylation of some of these sites using more sensitive and quantitative approaches. We were particularly interested to look for H3K56ac because several recent publications have implicated this modification in replication-coupled nucleosome assembly, regulation of gene expression and the DNA damage response (Das *et al.* 2009, Michishita *et al.* 2009, Tjeertes *et al.* 2009, Xie *et al.* 2009, Yuan *et al.* 2009, Miller *et al.* 2010, Schwer *et al.* 2010, Vempati *et al.* 2010, Battu *et al.* 2011, Kong *et al.* 2011, Li *et al.* 2011, Lo *et al.* 2011, Vempati 2011). In addition, based on immunohistochemistry, it has been argued that H3K56ac is a diagnostic and prognostic marker of several different types of tumours (Das *et al.* 2009). However, studies of H3K56ac in human cells have been fraught with controversy, particularly with regards to the role of this histone modification in the DNA damage response (Das *et al.* 2009, Yuan *et al.* 2009, Miller *et al.* 2010, Vempati *et al.* 2010, Battu *et al.* 2011, Vempati 2011), but also the identity of the enzymes that acetylate or deacetylate H3K56 (Das *et al.* 2009, Michishita *et al.* 2009, Tjeertes *et al.* 2009, Yuan *et al.* 2009, Miller *et al.* 2010, Schwer *et al.* 2010, Vempati *et al.* 2010, Kong *et al.* 2011, Li *et al.* 2011, Lo *et al.* 2011).

To detect H3K56ac and determine its stoichiometry, we used two approaches: MRM on an AB Sciex 4000 Q-Trap hybrid triple quadrupole-linear ion trap mass spectrometer, and a high-resolution quantitative approach on a Thermo Orbitrap-LTQ XL instrument. An absolute quantitation method was developed using both an H3K56ac synthetic peptide and an isotopically labeled standard of the target tryptic peptide (YQK₅₆(ac)STELLI*I), where I* is a [¹³C₆¹⁵N₁]-labeled isoleucine residue.

The unmodified (K56 propionylated) ion was detected in high abundance in the non-targeted LC-MS/MS analyses described earlier. An MRM method was built based on the MS/MS spectra of both synthetic peptides (Figures III.4a and III.4b). Four precursor/fragment ion pairs were selected to design an MRM method for detection of the corresponding tryptic peptides (see Supplementary information for details). We also monitored the unmodified form (YQK₅₆(pr)STELLIR), together with another H3 peptide (YRPGTVALR) to normalize for the amount of H3 present in different samples. Following HPLC fractionation of acid extracts (50 µg of starting material), our MRM assay was used to screen for the presence of H3K56ac in K562 and HeLa cells treated with various HDACi, including sodium butyrate, SAHA, MS-275, and nicotinamide. The modified K56ac residue was detected at low abundance in all cell types and conditions tested, consistent with the LC-MS/MS analyses described in the previous section. Figure III.4c shows LC-MS/MS results for H3K56ac in K562 cells treated with SAHA for 6h. Four MRM transition channels corresponding to the formation of diagnostic y- and b-type fragment ions were monitored. This strategy unambiguously identified a K562 cell-derived peptide that contained H3K56ac and eluted at 26 min (Figures III.4c and III.4d). First, the K56-acetylated peptide co-eluted with the [¹³C₆¹⁵N₁-isoleucine]-labeled internal standard (Figures III.4c and III.4d). Second, as expected, fragment ions from the K562 cell-derived H3K56ac peptide were 7 Th lighter than the corresponding fragment ions from the internal standard containing [¹³C₆¹⁵N₁]-isoleucine (Figures III.4a and III.4b). The stoichiometry of acetylation was calculated using the peak areas of the ion signal corresponding to the K56ac peptide divided by the sum of the areas of the K56ac and K56pr peptides. The stoichiometry of H3K56ac in transformed human cells (K562 or HeLa) is shown in Table 1. The stoichiometry of K56ac determined by MRM was 0.03% in all conditions tested, and did not change upon prolonged incubation with any of the HDACi that we tested.

Table III. 1 Stoichiometry and amounts of H3K56ac detected in transformed cells exposed to different HDACi

Table 1 Stoichiometry and amounts of H3K56ac detected in transformed cells exposed to different HDACi				
Conditions	Amount of H3 K ₅₆ (ac) peptide detected LTQ-Orbitrap (attomol)		Stoichiometry of H3 K ₅₆ (ac) (%) LTQ-Orbitrap	Stoichiometry of H3 K ₅₆ (ac) (%) MRM
K562, control (0 h)	160		0.05	0.03
K562, control (6 h)	198		0.05	0.03
K562, control (24 h)	224		0.05	0.03
K562, MS-275 (6 h)	169		0.05	0.03
K562, MS-275 (24 h)	297		0.05	0.03
K562, SAHA (6 h)	206		0.05	0.03
K562, SAHA (24 h)	164		0.05	0.03
K562, nicotinic acid (12 h)	201		0.05	0.03
K562, nicotinamide (12 h)	205		0.05	0.03
K562, nicotinamide (24 h)	291		0.07	0.03
HeLa, butyrate (24 h)	367		0.08	0.03

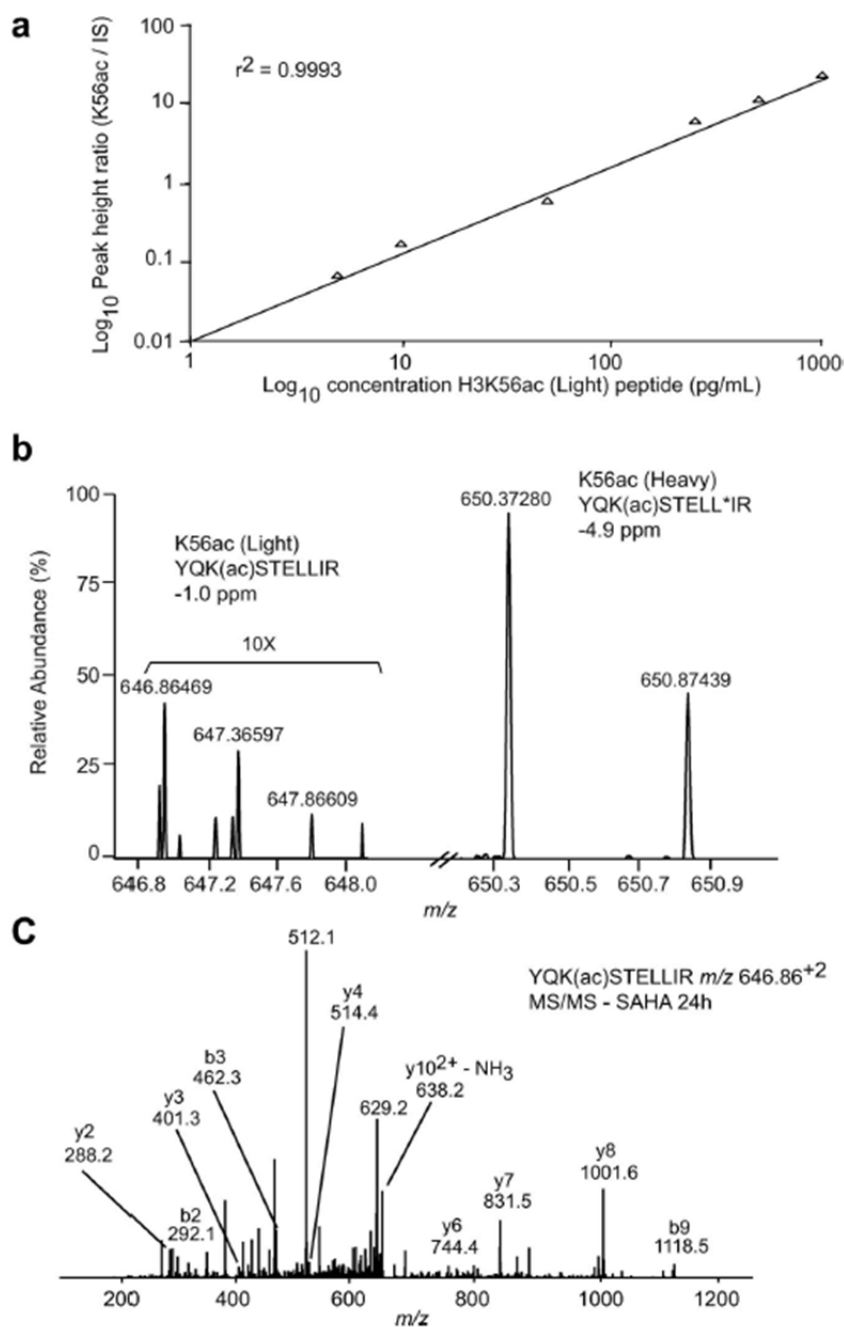


Figure III.5 LC-MS/MS analysis of H3K56ac from K562 cells using an LTQ-Orbitrap XL mass spectrometer.

(a) Samples (see Experimental Section) were prepared by mixing solutions of increasing concentrations (from 5 to 1000 pg/mL) of [¹²C-isoleucine]-containing K56-acetylated peptide with a fixed amount (100 pg/mL) of internal standard (IS) peptide (YQK₅₆(ac)STELLI*R), where I* is a [¹³C₆¹⁵N₁]-labeled isoleucine residue). The y-axis is the peak height abundance ratio (as determined by LC-MS) of the

YQK₅₆(ac)STELLIR peptide (containing only the [¹²C] isotope) to that of the [¹³C₆¹⁵N₁]-labeled internal peptide standard (IS).

(b) Precursor ion mass spectrum (from LC-MS/MS analysis of histones derived from K562 cells treated with 1 mM SAHA for 24 h) showing the detection of the native YQK₅₆(ac)STELLIR peptide along with the [¹³C₆¹⁵N₁-isoleucine]-labeled internal standard. **(c)** MS/MS spectrum of precursor m/z 646.8621 from the analysis shown in (b). This spectrum confirms the identity of the natural peptide containing H3K56ac.

We also performed high-resolution LC-MS analyses on the LTQ-Orbitrap XL mass spectrometer to determine the stoichiometry of H3K56ac in the same samples. The absolute amount of H3K56ac in transformed cells was determined using a calibration curve spiked at levels ranging from 5 to 1000 pg/mL, containing a constant amount of the [¹³C₆¹⁵N₁]-labeled internal standard. In order to mimic, as closely as possible, the reaction conditions used to process human histones prior to MS, recombinant yeast histone H3 was propionylated and digested first, then spiked with increasing amounts of the synthetic peptide standard. The rationale was to generate reaction mixtures containing similar sets of peptides and chemical species as those produced during analysis of human cell-derived histones. Although recombinant yeast histone H3 is less complex and devoid of PTM33, the conditions of propionylation and trypsin digestion are similar, which helps tackle challenges to quantitation, such as chemicals that co-elute with the H3K56ac peptide of interest and might suppress its ionization. This is particularly important in this case because of the very low abundance of the H3K56ac peptide. The first residue of the yeast H3 tryptic peptide containing K56 is a Phe, instead of a Tyr residue in human H3. Hence, H3K56 tryptic peptides derived from yeast histones do not interfere with our quantitative analysis. Our calibration curve showed excellent linearity ($r^2 = 0.9993$) over the range of concentrations examined (Figure III.5a). We detected the authentic H3K56ac peptide at a level approaching the instrumental detection limit in all the human histone samples. An example of the precursor ion mass spectrum for the H3K56ac peptide derived from K562 cells treated with SAHA for 24h is shown in Figure III.5b. The

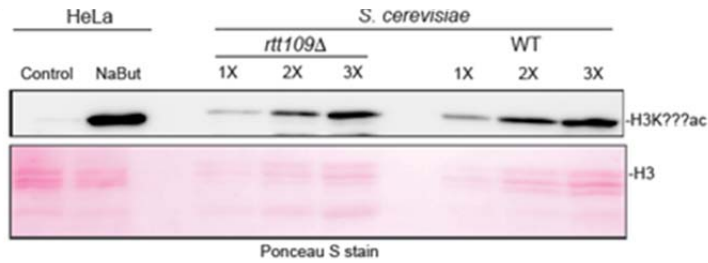
masses measured for the light and heavy labeled doubly protonated peptides were respectively within 1 ppm and 5 ppm of those calculated from their corresponding theoretical masses. An MS/MS spectrum that confirms the identity of the precursor ion corresponding to the human K56ac peptide is shown in Figure III.5c. The H3K56ac stoichiometry was determined from the ratio of the peak height of the doubly protonated K56ac tryptic peptide divided by the sum of the peak heights for the K56ac and K56pr peptides. The results from high-resolution LC-MS analyses are shown in Table 1, together with the absolute amount of tryptic peptide detected. The amount of H3K56ac present in all conditions ranged from 150 to 370 attomol, while the acetylation stoichiometry varied from 0.05-0.08%. Consistent with our MRM experiments, no significant change in the stoichiometry of H3K56ac was detected under any of the conditions examined, and even after prolonged incubation (up to 24h) of K562 or HeLa cells with HDACi that target different classes of deacetylases (Table 1). Thus, based on two different quantitative MS experiments, we find that the stoichiometry of H3K56ac (roughly 0.04%) is considerably lower than previously reported (1%) (Das *et al.* 2009, Xie *et al.* 2009). In addition, unlike other sites of acetylation, H3K56ac did not increase in response to several HDACi (Table 1). This was very intriguing because two of the HDACi that we used in our MS experiments, namely sodium butyrate and nicotinamide, were previously shown to increase H3K56ac based on immunoblotting (Das *et al.* 2009, Vempati *et al.* 2010).

This prompted us to investigate the specificity of three commercially available antibodies that were previously used to detect H3K56ac in human cells (Das *et al.* 2009, Michishita *et al.* 2009, Tjeertes *et al.* 2009, Miller *et al.* 2010, Schwer *et al.* 2010, Vempati *et al.* 2010, Battu *et al.* 2011, Lo *et al.* 2011, Vempati 2011). For these experiments, the same histone samples were analyzed either by MS or immunoblotting. The amounts of acid-extracted histones often used in immunoblots are sufficiently large to be readily detected by Ponceau S staining after histone transfer to nitrocellulose or PVDF membranes (Das *et al.* 2009, Tjeertes *et al.* 2009).

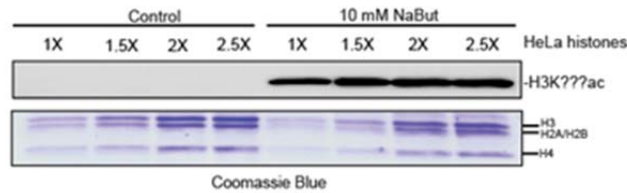
As previously reported (Das *et al.* 2009, Tjeertes *et al.* 2009, Vempati *et al.* 2010), we found that, under those conditions, sodium butyrate treatment of HeLa cells strongly increased the signal obtained with antibodies supposedly specific for H3K56ac (Figures III.6a and III.6b). However, with amounts of histones detectable by Ponceau S or Coomassie blue staining, the same antibodies also detected a considerable signal in histones purified from yeast *rtt109* Δ mutant cells (Figures III.6a and III.6c). In yeast, Rtt109 is the main enzyme that acetylates H3K56. Consistent with this, as judged by MS, H3K56ac is virtually absent from *rtt109* null mutant cells (Drogaris *et al.* 2008). Therefore, the immunoblotting signals detected by commercial antibodies in histones purified from *rtt109* Δ mutant yeast cells (Figures III.6a and III.6c) must be derived from modifications other than H3K56ac. Intriguingly, three of the six known acetylation sites located in the N-terminal domain of histone H3 share some sequence similarity with residues flanking H3K56 (Figure III.6d). Based on this, we hypothesized that commercial antibodies raised against H3K56-acetylated peptides might show some degree of cross-reactivity against abundant acetylation sites that bear similarity to residues flanking H3K56. To address this possibility, we obtained a set of six synthetic peptides, each containing a single acetylated lysine residue. These peptides represent all the known acetylation sites within the first 30 amino acid residues of histone H3 (Supplementary Figure III.S7). Each peptide was incubated with commercial antibodies raised against H3K56ac to determine whether they would block the ability of the antibodies to detect signals in immunoblots of histones purified from human cells. As control for a peptide that should block each antibody, we used a K56-acetylated synthetic peptide. As shown in Figure III.6e, in addition to the K56-acetylated peptide, three of the competitor peptides derived from the N-terminal domain of H3 either abolished or significantly reduced the immunoblotting signals obtained with histones purified from butyrate-treated HeLa cells. The K9ac peptide was the best competitor, but the K4ac and K27ac peptides also blocked some of the commercial antibodies that were reportedly H3K56ac-specific (Figure III.6e). This was true for two monoclonal antibodies (Figure III.6e) and a polyclonal antiserum from Millipore (data not shown). The latter

antibody is no longer commercially available but was previously used in several publications. Interestingly, the acetylated peptides that blocked the commercial antibodies were those that shared sequence similarity with residues flanking H3K56. In contrast, peptides acetylated at H3K14, H3K18 or H3K23, which lack similarity with residues that flank H3K56, all failed to block the antibodies in our competition experiments (Figure III.6d and III.6e). In cells treated with SAHA, we estimated by MS that the stoichiometry of H3K9ac (about 33%) is roughly 800-fold higher than that of H3K56ac (0.04%). These findings, combined with the fact that two quantitative MS approaches did not reveal an increase in H3K56ac, even after extended periods of incubation with several HDACi (Table III.1), lead us to conclude that several commercial antibodies previously used to study H3K56ac in human cells cross-react with sites of acetylation other than histone H3K56 and, particularly, H3K9. It is noteworthy that several studies reported that the abundance of H3K9ac and H3K56ac changed in the same direction under a variety of physiological conditions (Michishita *et al.* 2009, Tjeertes *et al.* 2009, Miller *et al.* 2010, Schwer *et al.* 2010, Li *et al.* 2011). Given the large stoichiometric excess of H3K9ac over H3K56ac, and the fact that antibodies raised against H3K56ac cross-react with H3K9ac, we suggest that these manuscripts described changes in the abundance of H3K9ac, rather than H3K56ac.

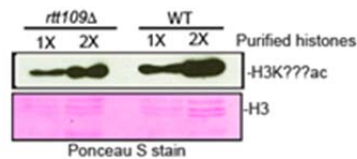
a) Upstate/Millipore antibody



b) Epitomics antibody



c) Epitomics antibody used in *S. cerevisiae* d)



Histone H3	
K4ac	1- ARTKQTA-7
K9ac	6- TARKSIG-12
K27ac	24-AARKSAP-30
K56ac	53-RYQKSTE-59
K14ac	11-TGGKAPR-17
K18ac	15-APRKQLA-21
K23ac	20-LATKAAR-26

e) Peptide competitor assays

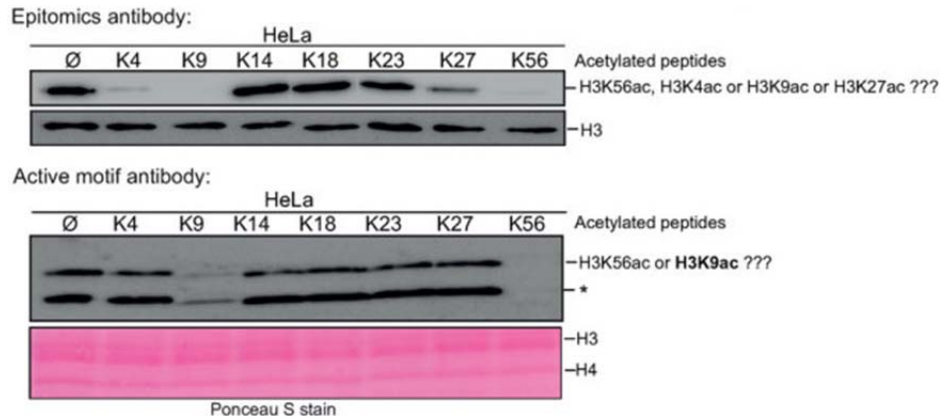


Figure III.6 Antibodies supposedly specific for H3K56ac cross-react against other acetylated lysine residues of histone H3.

(a) Immunoblot of core histones purified from control and butyrate-treated HeLa cells (NaBut), as well as WT and *rtt109Δ* yeast cells, probed with an antibody from Upstate/Millipore (07-677). (b) Immunoblot of core histones purified from control and butyrate-treated HeLa cells probed with the Epitomics antibody 2134-1. Comparable amounts of histones from control and butyrate-treated cells were loaded

as evidenced from the Coomassie Blue-stained gel. **(c)** Immunoblot with the Epitomics antibody of core histones purified from yeast cells lacking the H3K56 acetyltransferase Rtt109 (*rtt109Δ*) or WT cells. In panels (a) to (c), the “H3K???ac” label indicates that the immunoblotting signal could not be ascribed to a specific acetylated lysine(s). **(d)** Amino acid sequences flanking histone H3K56 and known acetylated lysines in the histone H3 N-terminal tail. Identical residues neighbouring acetylated lysines are highlighted. **(e)** Immunoblot of core histones purified from butyrate-treated HeLa cells were probed with monoclonal antibodies from Epitomics (2134-1) or Active Motif (61061) that were pre-incubated with different competitor peptides acetylated at specific lysine residues (histone H3 acetylated peptides). Ø: No competitor peptide. Equal loading of histones from HeLa cells was verified either by stripping the blot and reprobing it with an antibody that detects unmodified histone H3 (top panel) or by Ponceau S staining (bottom panel). (*) In addition to histone H3, the Active Motif antibody recognized a band that migrated faster than H3. Detection of this faster migrating species was blocked by H3K9ac and H3K56ac competitor peptides, suggesting that it is related to histone H3. In the same histone sample preparation, the Epitomics antibody did not recognize the band that migrated faster than H3.

III.5 Discussion

Our two-pronged approach to identify global changes in histone acetylation that arise from HDAC inhibition has led to three unexpected findings about the dynamics of histone acetylation in human cells. First, HDACi with either hydroxamic acid (SAHA) or benzamide (MS-275) inhibitory moieties both trigger global hyperacetylation of H3 and H4 in normal diploid fibroblasts and several transformed cell lines (K562, HeLa, HEK293T, and U937). Second, even when SAHA and MS-275 elicit global increases in H3 and H4 N-terminal tail acetylation in normal diploid fibroblasts, the cells did not lose viability (Supplementary Figures III.S2, III.S3 and III.S4). In the future, it will be interesting to determine if this is also the case in cancer cells and whether the cytotoxicity of SAHA and MS-275 has anything to do with their ability to globally enhance histone H3 and H4 acetylation (Bolden *et al.* 2006). Third, the development of two robust MS-based quantitative assays to determine the stoichiometry of histone H3K56ac in control and HDACi-treated cells has revealed some highly unexpected properties of this modification in human cells that are distinct from those of H3K56ac in yeast.

In *S. cerevisiae* and other yeasts, H3K56ac is very abundant during S-phase and G2. This is because essentially all the new H3 molecules are K56-acetylated prior to their deposition into nascent chromatin and subsequently deacetylated in late G2 or M-phase (Masumoto *et al.* 2005, Celic *et al.* 2006). Our data demonstrate that this is clearly not the case for H3K56ac in human cells. In contrast to the acetylation of many other residues in the H3 and H4 N-terminal domains (Waterborg 2002), it is puzzling that prolonged exposure to either class I/II or class III HDACi did not increase the stoichiometry of H3K56ac in transformed human cells. We cannot exclude the possibility that H3K56ac might slightly increase above 0.03% upon HDACi treatment. However, the very low stoichiometry of H3K56ac in human cells makes it unlikely that this modification can significantly contribute to genome-wide deposition of newly synthesized histone molecules. Our findings certainly do not rule

out the possibility that H3K56ac may have an important function in human cells. A stoichiometry of 0.03% corresponds to roughly one K56-acetylated H3 molecule every 3330 nucleosomes (or roughly every 667 Kb, assuming an average nucleosome repeat length of 200 bp). Given the size of the genome of a diploid human cell (roughly 6×10^9 bp), there would be approximately 9000 K56-acetylated H3 molecules per cell. Despite the intriguing absence of H3K56 deacetylation, some of these molecules may occur at specific chromosomal loci where H3K56ac might play important functions in either the DNA damage response or the regulation of gene expression (Das *et al.* 2009, Michishita *et al.* 2009, Tjeertes *et al.* 2009, Xie *et al.* 2009, Yuan *et al.* 2009, Miller *et al.* 2010, Schwer *et al.* 2010, Vempati *et al.* 2010, Battu *et al.* 2011, Falick *et al.* 2011, Kong *et al.* 2011, Lo *et al.* 2011, Vempati 2011). However, we would like to emphasize that reports of the presence of H3K56ac at specific loci (sites of DNA damage or gene regulatory elements), as determined by immunofluorescence or chromatin immunoprecipitation (ChIP) assays, are questionable because the H3K9 and H3K56 epitopes are related in sequence and H3K9ac is far more abundant than H3K56ac in human cells. Our study underscores the fact that even partial cross-reactivity of antibodies can lead to erroneous data interpretation when epitopes contain modified amino acids whose flanking residues share sequence similarity with other segments of the same protein. This may be an important issue for lysine residues in the N-terminal domain of histone H4, where three of the four known acetylated lysines reside in the sequence context GKG. As we demonstrated for H3K9ac and H3K56ac, this is particularly problematic when the stoichiometry of modification of the residue that should not be recognized by the antibody is much higher than the extent of modification of the intended target residue. To test whether this might be the case, and avoid false conclusions due to antibody cross-reactivity, we recommend quantitative mass spectrometry as a means to address the stoichiometry of modification of residues that are flanked by similar amino acid sequences. This is particularly important for studies of vertebrate cells, where it is not currently possible to mutate specific histone residues in order to rigorously prove antibody specificity in immunofluorescence or ChIP experiments. This is also a major

issue in immunohistochemistry. Overall, our findings demonstrate the importance of quantitative MS to determine the stoichiometry of specific protein modifications under a variety of physiological conditions and use this information to formulate hypotheses regarding the function(s) of these modifications.

III.6 Supplemental information

The MRM transitions used to detect histone H3K56 peptides were as follows.

1- H3K56pr

Sequence: YQK(pr)STELLIR

Precursor ion (m/z): 653.87₊₂

MRM transitions: 653.9₊₂ _ 1015.6₊₁ y8 fragment

653.9₊₂ _ 831.5₊₁ y7 fragment

653.9₊₂ _ 744.5₊₁ y6 fragment

653.9₊₂ _ 476.3₊₁ b3 fragment

2- H3K56ac (light form)

Sequence: YQK(ac)STELLIR

Precursor ion (m/z): 646.86₊₂

MRM transitions: 646.9₊₂ _ 1001.6₊₁ y8 fragment

646.9₊₂ _ 831.5₊₁ y7 fragment

646.9₊₂ _ 744.5₊₁ y6 fragment

646.9₊₂ _ 462.2₊₁ b3 fragment

3- H3K56ac (heavy form, internal standard)

Sequence: YQK(ac)STELL*IR

Precursor ion (m/z): 650.36₊₂

MRM transitions: 650.4₊₂ _ 1008.6₊₁ y8 fragment

650.4₊₂ _ 838.5₊₁ y7 fragment

650.4₊₂ _ 751.5₊₁ y6 fragment

650.4₊₂ _ 462.2₊₁ b3 fragment

4- YRPGTVALR (normalization peptide)

Precursor ion (m/z): 516.80₊₂

MRM transitions: 516.8₊₂ _ 713.4₊₁ y7 fragment

516.8₊₂ _ 616.4₊₁ y6 fragment

5- H4K91ac

Sequence: K(pr)TVTAMDVVYALK(ac)R

Precursor ion (m/z): 846.97₊₂

MRM transitions: 846.9₊₂ _ 1207.7₊₁ y12 fragment

846.9₊₂ _ 1136.6₊₁ y10 fragment

846.9₊₂ _ 1005.6₊₁ y9 fragment

846.9₊₂ _ 890.6₊₁ y8 fragment

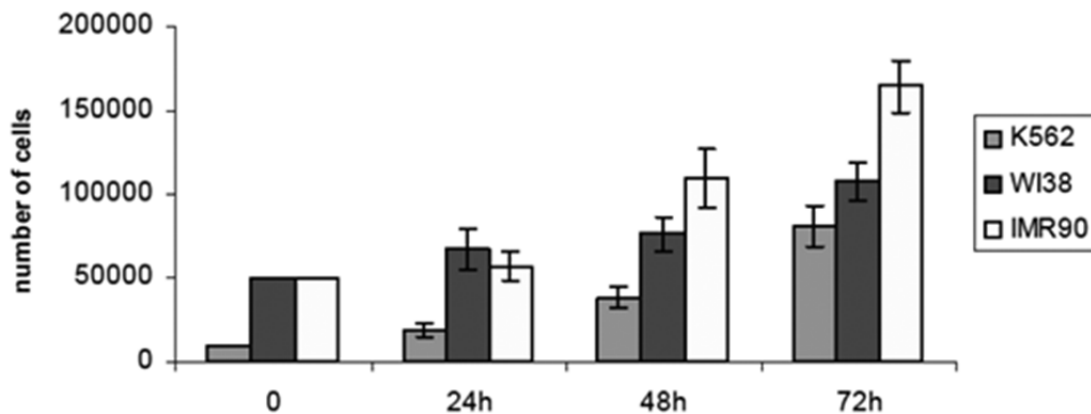


Figure III.S1. Doubling time for different cell types. Cell counts were obtained from three independent measurements.

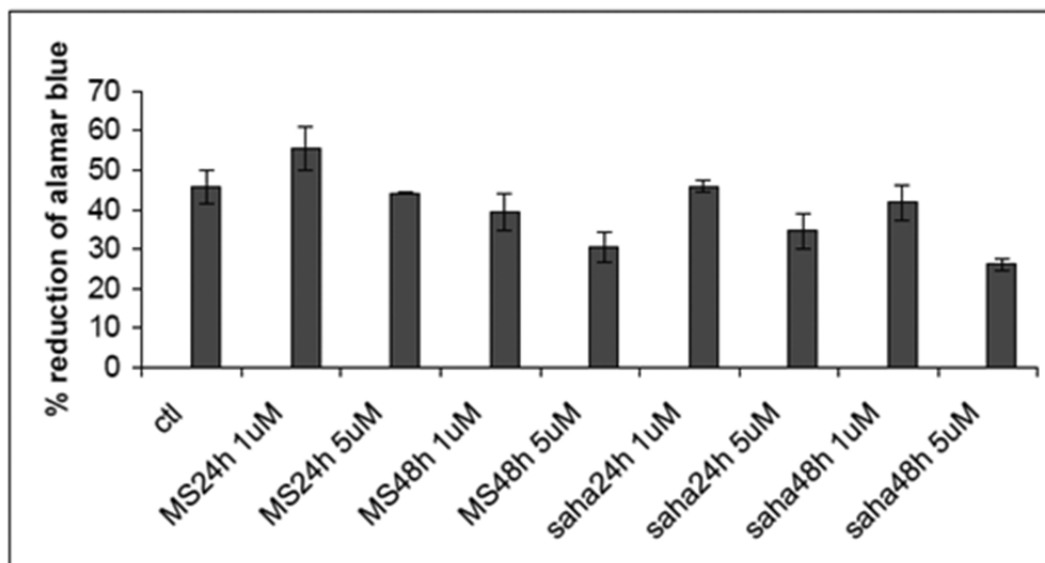


Figure III.S2. Cell viability assay for K562 cells exposed to different concentrations of SAHA and MS-275 for periods up to 48h. The percentage of Alamar blue reduction was obtained from triplicate independent measurements.

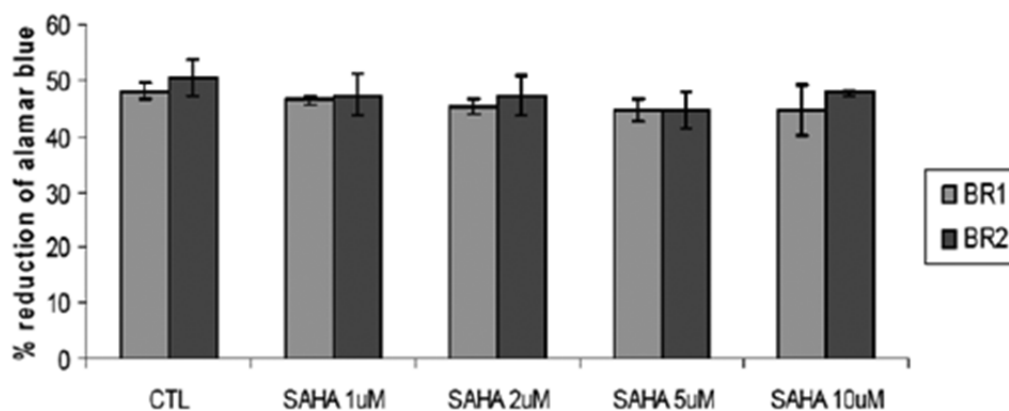


Figure III.S3. Cell viability assay for IMR90 normal diploid fibroblasts exposed to different concentrations of SAHA for 48h. BR indicates biological replicates. The percentage of alamar blue reduction was obtained from triplicate independent measurements.

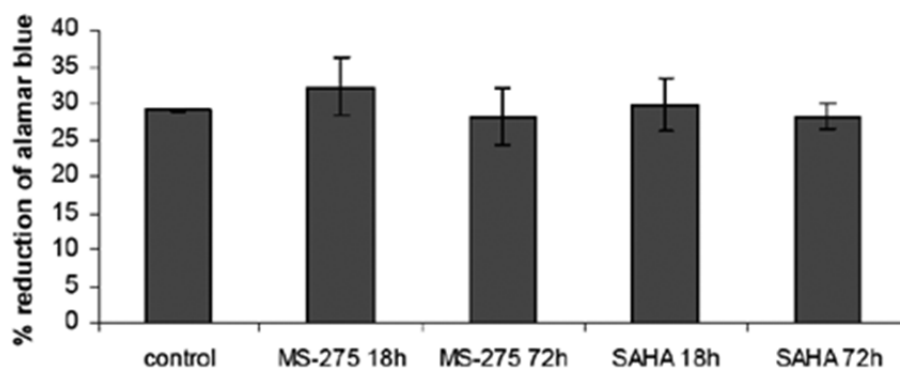


Figure III.S4. Cell viability assays performed with WI38 normal diploid fibroblasts cells exposed to 1 μ M SAHA or 1 μ M MS-275 for different periods of time. The percentage of alamar blue reduction was obtained from triplicate independent measurements.

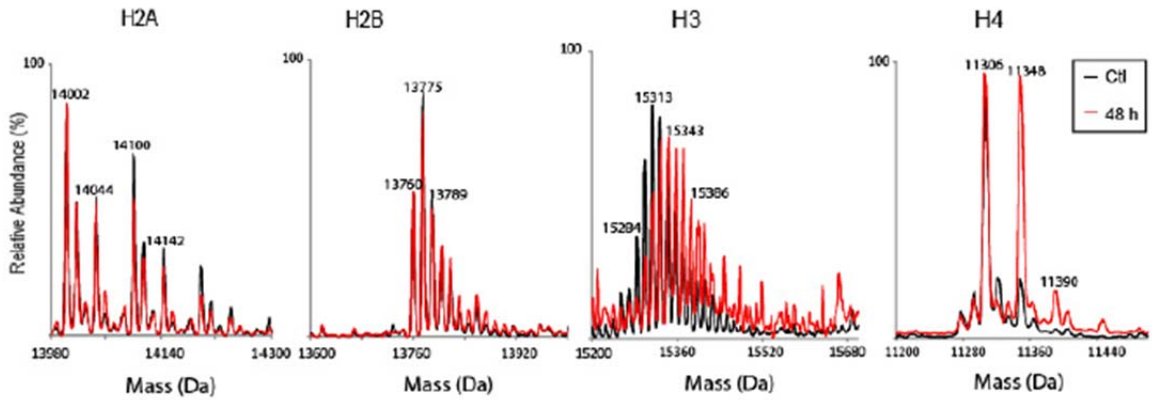


Figure III.S5. LC-MS analyses of intact histones derived from IMR90 normal diploid fibroblast cells. Color lines indicate histones purified from control cells (black), and cells treated with 1 μ M SAHA for the indicated times (red).

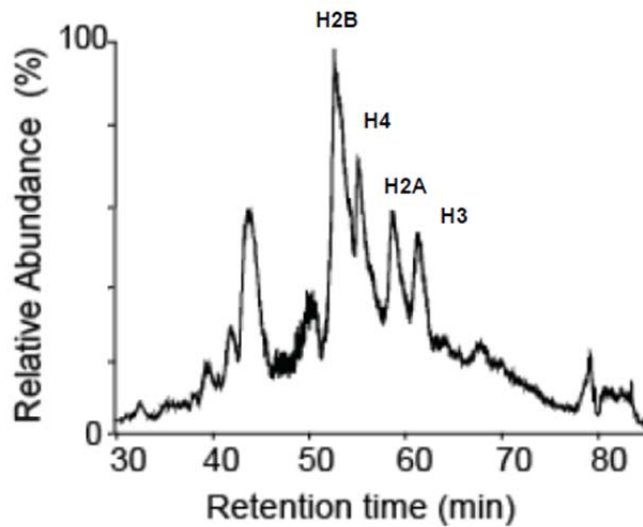


Figure III.S6. Total ion chromatogram (TIC) for histones derived from control K562 cells that were not treated with SAHA. The abundance of each peak was estimated relative to that of the highest peak. Retention time refers to the elution time from the reverse phase HPLC column in-line with the mass spectrometer.

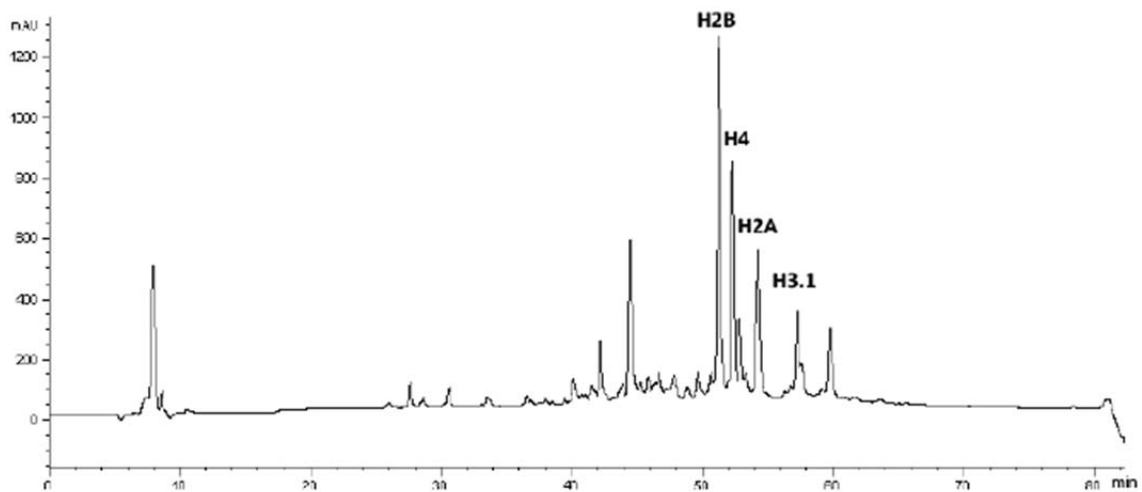


Figure III.S7. LC-UV chromatogram corresponding to the fractionation by reverse-phase HPLC of intact core histones that were acid-extracted from control K562 cells.

Synthetic peptide	Sequence
H3K4ac	1-ART(Kac)QTARKSTG-12
H3K9ac	4-KQTAR(Kac)STGGKA-15
H3K14ac	10-STGG(Kac)APRK-18
H3K18ac	16-PR(Kac)QLATK-23
H3K23ac	19-QLAT(Kac)AARKSA-29
H3K27ac	24-AAR(Kac)SAPAT-32
H3K56ac	52-RRYQ(Kac)STELLIR-63

Figure III.S8. Synthetic peptides used as competitors in the immunoblotting assays shown in Figure III.6E.

Table III.S 1 to 10. Histone H3 volcano plot intensity data

To consult the raw data from figure III.3 in a pdf format at the optimal resolution, please go to the Scientific Report website or use the link below to directly have access to the pdf files.

<http://www.nature.com/srep/2012/120112/srep00220/extref/srep00220-s1.pdf>

III.7 Supplemental information

Chemicals and other reagents

Trichostatin A (TSA, Sigma), nicotinamide (Sigma), nicotinic acid (Sigma), phenyl butyrate (Calbiochem) were solubilized in water. MS-275 (Calbiochem) and Vorinostat (SAHA, Cayman chemical) were solubilized in DMSO. Human H3K56ac peptide (YQKacSTELLIR) and its isotopically-labeled analogue (YQKacSTELL[13C615N1]-IR) were synthesized by Midwest Biotech (Fishers, IN). HPLC columns for histone fractionation were purchased from Phenomenex (Torrance, CA) and Canadian Life Sciences. Pre-columns (4 mm x 360 μ m I.D.) and capillary columns (100 mmx 150 μ m i.d.) were packed in-house using Jupiter C18, 3 μ m particles (Phenomenex) and fused silica tubing (Polymicro Technologies). Milli-Q water and Optima grade acetonitrile (Fisher Scientific) were used as HPLC solvents. Trifluoroacetic acid (TFA), ammonium bicarbonate, and propionic anhydride were obtained from Sigma. Formic acid was obtained from EMD Science. Porcine modified trypsin (sequencing grade) was obtained from Promega. The protein content in histone extracts was measured using the Micro-BCA assay (Thermo Fisher Scientific). Cell viability was assessed using the alamar blue assay kit (Invitrogen).

Cell culture and histone preparation

K562 cells were cultured in RPMI-1640, IMR90 and WI-38 cells in DMEM with 10% FBS and 1% Pen-Strep in a 5% CO₂ incubator at 37°C. For experiments with HDACi, cells were seeded in 150 cm² dishes at 0.5 million cells/mL in 25 mL of culture medium. Cells treated with HDACi were collected and lysed in hypotonic lysis buffer (10 mM Tris-HCl pH 7.5, 3mM CaCl₂, 2mM MgCl₂, 1 mM DTT, 1X EDTA-free protease and phosphatase inhibitor cocktail, 1 mM PMSF, 10 mM sodium butyrate, 10 μ M trichostatin A and 10 mM nicotinamide). Cells were lysed in a metallic dounce homogenizer and nuclei were collected by centrifugation (13,500 rpm, 15 min, 4 °C). The nuclei were then resuspended in 0.4M H₂SO₄ to extract

histones as previously described (Shechter *et al.* 2007). Histones were dissolved in 0.2% formic acid and stored frozen at -80 °C.

Flow cytometry and cell viability

After HDACi treatments, 1 million cells were washed with cold PBS and fixed in a 70% cold ethanol-PBS solution overnight at -20 °C. Cells were washed three times with PBS and DNA stained with a propidium iodide (PI) solution (50µg/ml PI, 0.1% sodium citrate, and 0.2 mg/ml ribonuclease A) for 30 min at 4°C. DNA content was measured by flow cytometry (BD Biosciences). Viability of cells after HDACi treatment was assessed using the alamar blue cell viability assay (Invitrogen). Cells were seeded in a 96-well plate at 5000 cells/well and incubated for three hours at 37 °C with 10% alamar blue. Absorbance was read at 570 nm and 600 nm to determine cell viability by calculating the percentage of alamar blue reduction (Larson *et al.* 1997).

III.8 Acknowledgments

This work was supported by funding from the Collaborative Health Research Program of the Natural Sciences and Engineering Research Council (NSERC) and the Canadian Institutes for Health Research (CIHR) to A.V. and P.T and the Canadian Cancer Research Society to G.F. The Institute for Research in Immunology and Cancer receives infrastructure support from the Canadian Center of Excellence in Commercialization and Research, the Canadian Foundation for Innovation, and the Fonds de la Recherche en Santé du Québec.

Chapitre IV

Histone H3 Lysine 56 Acetylation as a Cancer Biomarker?

Chapitre IV. Histone H3 Lysine 56 Acetylation as a Cancer Biomarker?

Valérie Villeneuve, Julie Hinsinger, Alain Verreault[#], Louis Gaboury[#]

[#]Corresponding authors: Louis Gaboury and Alain Verreault

Running title: Histone H3 Acetyl-Lysine 56 monoclonal antibody evaluation as a diagnosis tool to distinguish normal cells from cancer cells

Key words: Histone H3 K56 acetylation, DNA damage response, chromatin assembly, antibody specificity, cancer prognosis marker, cancer pathology, diagnostic marker.

This chapter corresponds to a manuscript to be submitted to Cell Cycle

IV.1 Abstract

In eukaryotic cells, histone modifications regulate many biological processes such as transcription, DNA replication, and DNA repair. In the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*, histone H3 lysine 56 is acetylated (H3K56Ac) during S-phase when it plays a role in chromatin assembly and DNA damage survival. In this report, we present an overview of the known functions of H3K56Ac in yeast and the functions that have been ascribed to this modification in human cells. Based on immunohistochemistry (IHC) and immunoblotting, it has been reported that the abundance of H3K56Ac was strikingly high in cancer cells, suggesting that this modification was a promising diagnostic tool for several types of cancers. Unfortunately, our own IHC data revealed that the antibodies previously used for H3K56Ac studies are not suitable for cancer diagnosis.

IV.2 Introduction

The eukaryotic genome is organized into a dynamic nucleoprotein structure known as chromatin (Luger *et al.* 1997). The nucleosome is the fundamental unit of chromatin and consists of 147 base pairs of DNA wrapped around a histone octamer composed of two copies of each of the four core histones known as H2A, H2B, H3 and H4 (White *et al.* 2001, Luger 2003). Histones are basic proteins that interact with each other and with DNA through their globular domains called the histone folds (Khorasanizadeh 2004). Histones also contain unstructured N-terminal and C-terminal tails that protrude outside of the nucleosomal surface (Khorasanizadeh 2004). Cells have developed several mechanisms to access DNA sequences wrapped around the surface of histone octamers. One of those mechanisms involves reversible covalent modifications by histone-modifying enzymes (Margueron *et al.* 2005). These post-translational modifications (PTMs) include acetylation, methylation, phosphorylation, ubiquitylation and many others (Khorasanizadeh 2004, Peterson and Laniel 2004, Chakravarthy *et al.* 2005). Fifteen years ago, Strahl and Allis proposed the histone code hypothesis, which states that histone PTMs create specific binding platforms that regulates the binding of chromatin-modifying enzymes which, in turn, modulate a wide diversity of biological processes (Strahl and Allis 2000, Jenuwein and Allis 2001).

H3K56Ac and replication-dependent nucleosome assembly in yeast

A well-known example in *Saccharomyces cerevisiae* is the acetylation of histone H3 lysine 56 (H3K56Ac) which is located near the DNA entry and exit points of the nucleosome core particle. H3K56Ac contributes to replication-coupled nucleosome assembly by enhancing the association of newly synthesized H3 molecules with the histone H3/H4 chaperones CAF-1, Rtt106 and Asf1 (Krawitz *et al.* 2002, Franco *et*

al. 2005, Masumoto *et al.* 2005, Groth *et al.* 2007, Li *et al.* 2008, Rocha and Verreault 2008). In *S. cerevisiae*, essentially all the new H3 molecules deposited throughout the genome during S-phase are K56-acetylated (Celic *et al.* 2006). Interestingly, this PTM was also detected by mass spectrometry in human cells at very low abundance, about 1% of total H3 molecules, which is far less abundant than in yeast (Garcia *et al.* 2007, Drogaris *et al.* 2012).

The histone acetyltransferase (HAT) Rtt109, in a complex with the chaperone Asf1 is the main, and possibly the only HAT that acetylates H3K56 prior to its assembly into nucleosomes (Schneider *et al.* 2006, Driscoll *et al.* 2007, Tsubota *et al.* 2007, Han *et al.* 2007b, Fillingham *et al.* 2008). Moreover, in the absence of DNA damage, H3K56Ac is removed from chromatin before cells complete mitosis (Masumoto *et al.* 2005, Celic *et al.* 2006). In yeast, the removal of H3K56Ac is performed by Hst3 and Hst4, two paralogues of the histone deacetylase Sir2 (Celic *et al.* 2006, Maas *et al.* 2006). Asynchronous cells in *S. cerevisiae* contain 20 to 30% of H3 molecules that are H3K56Ac. The H3K56Ac mark and the nucleosome assembly pathway are important for cell survival in response to DNA damage that occurs during replication (Li *et al.* 2008).

A role for yeast H3K56Ac in replication-independent nucleosome assembly and gene expression

During S-phase, newly synthesized histones are incorporated into chromatin in a replication-dependant manner. However, histone deposition also occurs outside of S-phase (Dion *et al.* 2007, Rufiange *et al.* 2007). Furthermore, the H3K56Ac mark is not exclusively present in S-phase. Indeed, newly synthesized histone H3 molecules are acetylated at lysine 56 and incorporated into chromatin in G1-arrested cells (Rufiange *et al.* 2007, Kaplan *et al.* 2008). It is also interesting to note that H3K56Ac

enrichment correlates with histone H3 turnover (*i.e.* dissociation and reincorporation of H3 into chromatin) by ChIP-chip (Rufiange *et al.* 2007). Furthermore, H3K56Ac may be involved in rapid histone turnover in yeast because strains deleted for the *RTT109* or the *ASF1* gene show very slow histone turnover compared to the WT strain (Kaplan *et al.* 2008). Therefore, these data strongly suggest a role in H3K56Ac in replication-independent histone deposition at dynamically regulated chromatin regions.

H3K56Ac has been shown to contribute to proper gene expression. Indeed, in a strain where H3 lysine 56 is replaced by an arginine (H3K56R) to prevent H3K56Ac, whole-genome expression profiling showed that 150 RNAs were less abundant than in WT cells (Xu *et al.* 2005). Moreover, an *H3K56R* mutant strain shows lower expression of all four H2A and H2B genes compared to the WT strain and deficient activation of the *SUC2* gene, which is regulated by the SWI/SNF remodeling complex (Geng *et al.* 2001, Xu *et al.* 2005). Furthermore, Rtt109 was proposed to be an activator of the histone gene *HTA1* (Fillingham *et al.* 2009) and, in the yeast *PHO5* promoter, H3K56Ac and Asf1 are thought to promote *PHO5* gene transcription in a process involving nucleosome disassembly (Williams *et al.* 2008). Consistently, these findings support the idea that H3K56Ac, Asf1 and Rtt109 have together an important function in gene expression.

A role for H3K56Ac in the yeast DNA damage response

Yeast cells lacking H3K56Ac are extremely sensitive to DNA damaging agents such as methyl methane sulfonate (MMS) or camptothecin (CPT), suggesting that H3K56Ac is required to complete DNA repair (Wurtele *et al.* 2012). In fact, H3K56R mutants are more sensitive to DNA damage than cells lacking either CAF-1 or Rtt106 (Li *et al.* 2008). Several research groups reported that the presence of lysine 56

acetylation on H3 molecules contributes to DNA repair (Masumoto *et al.* 2005, Driscoll *et al.* 2007, Chen *et al.* 2008, Clemente-Ruiz *et al.* 2011, Wurtele *et al.* 2012, Zhang *et al.* 2014). Recently, Wurtele *et al.* also reported that H3K56Ac-deficient cells exposed to MMS contain persistent segments of non-replicated DNA, but eventually segregate chromosomes with lesions containing the homologous recombination (HR) protein Rad52 (Wurtele *et al.* 2012). These results are consistent with an important role of H3K56Ac in the DNA damage response.

K56-Acetylated H3 molecules in mammalian cells

During recent years, several research groups have reported that H3K56 acetylation is a PTM involved in the DNA damage response, DNA synthesis and chromatin assembly in mammalian cells (Das *et al.* 2009, Yuan *et al.* 2009, Dovey *et al.* 2010, Miller *et al.* 2010, Schwer *et al.* 2010, Lo *et al.* 2011, Tan *et al.* 2013). Studies in fly and human cells showed that the Rtt109-related enzymes CBP/p300 promote H3K56 acetylation of newly synthesized histones (Garcia *et al.* 2007, Tang *et al.* 2008, Das *et al.* 2009, Yuan *et al.* 2009, Vempati *et al.* 2010). Tjeerte *et al.* rather proposed H3K56 to be acetylated by GCN5 and claimed that the role of p300 in acetylation of H3K56 is unclear in the context of DNA damage response (Tjeertes *et al.* 2009). Further studies are needed to clarify which HAT acetylates H3K56 in human cells during DNA damage response. Moreover, in mammalian cells, ASF1a and ASF1b are two homologues of yeast Asf1, but only ASF1a may have a role in H3K56Ac (Yuan *et al.* 2009).

In mouse embryonic stem cells (ESCs), Tan *et al.* observed that the transcription factor Oct4, a member of the NOS (Nanog, Sox2, Oct4) pluripotency factors, binds to acetylated H3K56 *in vivo* and *in vitro* in order to promote pluripotency as the NOS complex down-regulation is seen after shASF1a transfection (Tan *et al.* 2013). Furthermore, SIRT1 and SIRT2 were recognized as the deacetylases that remove the

acetylation group of H3K56 (Das *et al.* 2009, Vempati *et al.* 2010). On the other hand, in embryonic stem cells, the loss of Histone Deacetylase 1 (HDAC1) alone results in increased H3K56Ac (Dovey *et al.* 2010). Although contradictory, those results in human cells suggest that the modulation of H3K56Ac levels by enzymes such as sirtuins, HDACs or HATs may have a role in chromatin regulation.

H3K56Ac and DNA damage response in mammalian cells

Two new studies showed an increase of H3K56Ac levels when cells are treated with DNA damaging agents such as MMS and CPT, while Battu and colleagues observed a transient reduction of H3K56Ac levels in response to UV irradiation with a full restoration of H3K56Ac status after 24 hours following UV irradiation (Das *et al.* 2009, Yuan *et al.* 2009, Battu *et al.* 2011). In line with this previous result, Tjeertes *et al.* identified HDAC1 and HDAC2 to be required for hypoacetylation of H3K56 at sites of DNA damage (Costelloe and Lowndes 2010, Miller *et al.* 2010). Yuan and colleagues also found that SIRT1 removed H3K56Ac and showed that spontaneous DNA damage occurred at a higher level in SIRT1^{-/-} mouse embryonic fibroblasts (MEFs) than in cells reconstituted with WT SIRT1 (Yuan *et al.* 2009). It is unclear whether the acetylation observed in this report is specific for H3K56 because loss of SIRT1 also causes an increase in H3K9 acetylation and antibodies against H3K56Ac also react against H3K9Ac (Drogaris *et al.* 2012). This is a serious concern because H3K9Ac is far more abundant than H3K56Ac in human cells (Drogaris *et al.* 2012). The role of the sirtuin SIRT6 in H3K56 deacetylation is also questionable given that loss-of-function of SIRT6 also causes an increase in H3K9 acetylation (Michishita *et al.* 2008, Yang *et al.* 2009, Toiber *et al.* 2013). In human cells, the enzyme(s) that deacetylate H3K56 and whether H3K56 acetylation and/or deacetylation truly play a role in the DNA damage response remain unresolved.

Several of the aforementioned studies led to conflicting results. One possibility that, at least in part, might explain the conflicting data reported in previous studies could be that some of the antibodies used in these studies cross-react with acetylated residues that are flanked by residues similar to those that surround H3K56. These include H3K4, H3K9 and H3K27 (Drogaris *et al.* 2012). Despite the fact that Yuan *et al.* had tested the specificity of their antibody for H3K56Ac using two competitor peptides, namely H3K56Ac and H3K56me, we cannot exclude the possibility that this antibody also recognizes sites of acetylation other than H3K56Ac (*e.g.* H3K9Ac). Sensitivity to genotoxic agents and high levels of γ -H2AX foci in cells expressing both wild-type H3 and either H3K56R or H3K56Q was reported by Yuan *et al.* (Yuan *et al.* 2009). However, their results could also be due to the presence of modifications other than acetylation. Indeed, histone H3 lysine 56 mono-methylation (H3K56me1) was proposed to regulate replication through its interaction with PCNA in mammalian cells (Yu *et al.* 2012).

Antibodies as a Tool to Study Histone Acetylation

The validity of immunoblots, chromatin immunoprecipitation, immunofluorescence and immunohistochemistry results is critically dependent on antibody specificity. The ideal specificity control for each assay is a cell type where the target lysine residue is mutated into an arginine to prevent its acetylation. Unfortunately, unlike in yeasts (*S. cerevisiae* and *S. pombe*), it is not possible to obtain mammalian cells where the only source of a given histone carries a lysine-to-arginine mutation of the residue of interest. This is because replication-coupled histone genes are present in large clusters that contain multiple copies of each type of core histone gene (Marzluff *et al.* 2002).

It was estimated that at least 25% of commercial antibodies have substantial specificity problems, often recognizing the wrong histone or recombinant histones produced in *E. coli*, which are devoid of modification (Egelhofer *et al.* 2011, Drogaris *et al.* 2012). Thus, the choice of antibodies to study mechanisms involving H3K56Ac, and histone modifications in general, should be carefully considered and users should rigorously test each lot of commercially available antibodies under conditions that match, as much as possible, the conditions in which the antibody will be used experimentally. There are at least three reasons for this. First, using WT and lysine-to-arginine histone mutants of *S. cerevisiae*, we found that many antibodies that appear fairly specific in some assays (*e.g.* immunoblotting) only exhibit a narrow range of conditions (such as antibody concentrations), where they are specific for modification of the target residue in chromatin immunoprecipitation or immunofluorescence assays. Second, antibodies that are specific in whole-cell lysates of WT and lysine-to-arginine histone mutants lose their specificity when the same antibodies are used to probe immunoblots prepared from purified histones, which typically contain amounts of each core histone that can be readily detected by Coomassie Blue staining (Drogaris *et al.* 2012). Third, even when yeast lysine-to-arginine mutants are used to validate antibody specificity, there is no guarantee that this specificity will be preserved when the same antibodies are employed in mammalian cell experiments. This is because, based on mass spectrometry, the stoichiometries of certain histone modifications are vastly different in yeast and mammalian cells and histones contain several acetylated lysines that are flanked by similar residues. Finally, the findings described by Das and colleagues raised the possibility that these antibodies might prove valuable for cancer diagnosis or prognosis. We therefore set out to test the same antibodies in immunohistochemistry.

IV.3 Experimental procedures

Tissue microarray preparation

3µm thick tissue microarray sections from both breast and colon cancer samples were used to evaluate expression patterns of epitopes detected by antibodies previously reported as specific for H3K56Ac. These tissue microarrays were prepared from 38 patients represented by 1 mm core triplicates for the first breast cancer array; 49 patients represented by 1mm core duplicates for the second breast cancer array and 43 patients represented by 1mm core duplicates for the colon cancer array (pathological data available upon request). Immunostaining with the H3K56Ac rabbit monoclonal antibody from Epitomics (catalogue number 2134-1, lot number EPR996Y), was performed using a Discovery XT automated immunostainer (Ventana Medical Systems, Tucson, AZ). Antigen retrieval was performed with proprietary reagents, using Ventana Cell conditioner 1 for 30 min. The rabbit monoclonal H3K56Ac antibody (1/100 in PBS (Phosphate buffered saline), Epitomics) was applied on tissue microarrays for 60 min at room temperature. Sections were then incubated with a biotinylated anti-rabbit IgG secondary antibody. Streptavidin horseradish peroxidase, and 3,3'-diaminobenzidine were used according to the manufacturer's instructions (DAB map kit from Ventana Medical Systems, Tucson, AZ). Finally, sections were counterstained with hematoxylin and bicarbonate. Each section was scanned at a high resolution using the Nanozoomer Digital Pathology (Hamamatsu, Bridgewater, NJ). Adjacent sections or close cut sections from each tissue array were also stained with Ki-67 (1/100 in PBS, Biocare), a well-known proliferation marker, and a control rabbit IgG according to the same staining protocol described above.

IV.4 Results

Antibodies against H3K56Ac and their use for cancer diagnosis

Tumor biomarkers are molecules produced by cancer cells or by other cells of the body in response to cancer (Gold and Freedman 1965, National Cancer Institute, 2011). Most tumor biomarkers are also produced by normal cells, but their level of expression is much higher in cancer cells. Those molecules are mainly proteins that can be found in blood, urine, feces, tumor tissues or other tissues of patients with certain type of cancers. In combination with other tests, biomarkers are used to detect and diagnose some types of cancers. Tumor biomarkers also help physicians select an appropriate therapy and follow cancer progression (National Cancer Institute, 2011). Sometimes, a biomarker can also help determine the grade of the cancer and its outcome (Smith and Somerfield 1997).

To address whether anti-H3K56Ac antibody employed by Das *et al.* would be an appealing tool to detect cancer cells, we tested by IHC the rabbit monoclonal antibody against H3K56Ac, hereafter referred to as EPR996Y because we previously showed that this antibody also reacts against H3K9Ac (Drogaris *et al.* 2012). We used EPR996Y to probe tissue microarrays from breast cancer subtypes, including triple negative, luminal A, Her-2 positive, low grade, typical and atypical medullary cases. In addition, we tested the same antibody using colon cancer microarray that included cases of mucinous adenocarcinoma and invasive adenocarcinoma that were either moderately or well differentiated. An IgG control was found to be completely negative on both the breast and colon tissue microarrays (data not shown). However, the H3K56Ac positive staining was observed in normal cells but also in smooth muscle, stromal and endothelial vascular cells, where no Ki-67 could be detected (figure IV.1A, C). Almost every tumor sample was found moderately to strongly positive for H3K56Ac. In some cases, positive staining for Ki-67 was observed but the H3K56Ac staining was negative in sections of certain breast cancer tissues (figure

IV.1D). A normal tonsil control tissue also provided valuable information. Ki-67 staining was found in germinal centers (Gc) of the lymphatic nodule whereas EPR996Y staining was detected only in the corona (Co) where mature B lymphocytes have a dense nucleus and are small normal lymphocytes undergoing clonal expansion (Figure IV.1B). Thus, no positive correlation could be made with the signal obtained with Ki-67 and EPR996Y in normal tonsil. Furthermore, in normal tissues such as tonsils, H3K56Ac staining is observed in proliferating cells unlike the data reported by Das and colleagues that suggested a correlation of H3K56Ac levels with tumorigenesis rather than proliferation (figure IV.1) (Das *et al.* 2009). In conclusion, the EPR996Y monoclonal antibody does not seem to be a suitable marker to distinguish cancer cells from normal cells.

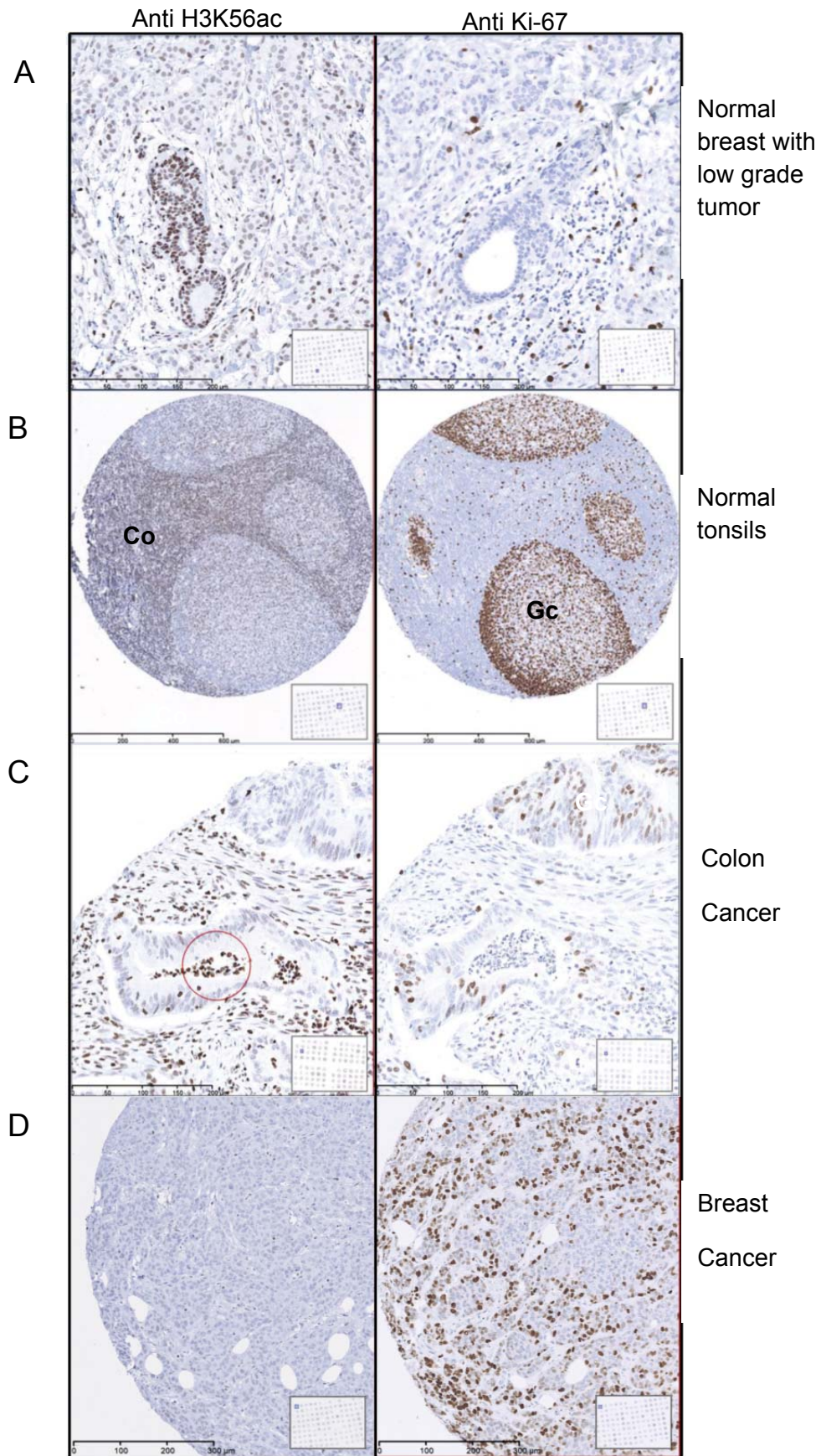


Figure IV.1. Immunohistochemistry performed with Epitomics EPR996Y antibody in 4 μm thick tissue microarray sections from normal tonsils, breast and colon cancer samples. (A, D) Breast cancer cells showing positive staining with EPR996Y, but negative staining with anti-Ki-67, a marker of cellular proliferation. **(B)** Normal tonsils showing that EPR996Y staining did not co-localize with Ki-67 staining in germinal centers. **(C)** Colon cancer cells showed positive staining with EPR996Y (red circle). However, these cells showed negative staining for the Ki-67 marker.

IV.5 Discussion

In yeast, the acetylation of H3K56 was shown to contribute to chromatin assembly during DNA replication and the DNA damage response (Krawitz *et al.* 2002, Rocha and Verreault 2008). However, the physiological role(s) of H3K56Ac in human cells is unclear due to contradictory published data coming from different research groups. Part of the controversial results likely arose because antibodies against H3K56Ac react against other acetylated residues such as H3K9 that are much more highly acetylated than H3K56 based on mass spectrometry (Drogaris *et al.* 2012 and this study). In fact, a number of studies reported that changes in H3K9Ac and H3K56Ac correlated under a variety of conditions, which is consistent with the possibility that antibodies against H3K56Ac likely detect changes in H3K9Ac (Michishita *et al.* 2009, Tjeertes *et al.* 2009, Dovey *et al.* 2010, Miller *et al.* 2010, Schwer *et al.* 2010, Vempati *et al.* 2010, Battu *et al.* 2011, Vempati 2011, Gu *et al.* 2012).

Despite this issue of cross-reactivity against different acetylation sites we tested an Epitomics antibody against H3K56Ac/K9Ac that had shown a remarkable ability to distinguish normal and cancer cells in a previous study (Das *et al.* 2009). Based on results obtained from tissue microarrays of breast cancer subtypes, colon cancers and normal tissues, we conclude that the Epitomics antibody against H3K56Ac/K9Ac is not suitable for cancer diagnosis. Deciphering the role of histone H3K56Ac in human cells will require novel antibodies and strategies to distinguish phenotypes that result from a lack of H3K56Ac as opposed to a loss of other H3K56 modifications, such as H3K56me1 (Yu *et al.* 2012). Another important question will be to determine whether phenotypes attributed to a loss of H3K56Ac in mammalian cells (*e.g.* DNA damage sensitivity) may in fact be caused by a loss of H3K9Ac or acetylation of other lysine residues.

Chapitre V

Discussion générale

Chapitre V Discussion générale

L'architecture de la chromatine est complexe et cette structure dynamique nécessite une régulation étroite des histones qui la constitue. Ainsi, de nombreux facteurs spécialisés faisant partie de différents mécanismes de surveillance assurent la stabilité génomique. Dans les cellules eucaryotes, un excès d'histones ou des modifications post-traductionnelles inappropriées des histones sont des erreurs pouvant entraîner de l'instabilité génomique. Cette thèse de doctorat a mis en lumière deux aspects distincts de la régulation des histones et s'est penchée sur la régulation transcriptionnelle et post-traductionnelle des histones dans deux contextes différents. Ce dernier chapitre de la thèse traite de l'importance de mes travaux, leurs implications, ainsi que de perspectives futures.

V.1 Implication du point de contrôle intra-S dans la répression des gènes d'histones

Le chapitre II traite principalement de la régulation du complexe HIR en réponse aux agents génotoxiques bien que durant la fin de mes études doctorales, mon intérêt s'est également tourné vers la régulation du complexe HIR dans un cycle cellulaire normal. Je me suis concentrée sur la stabilité de la protéine Hpc2 en vue d'obtenir des pistes de réponse quant à sa régulation dans le cycle cellulaire.

V.1.1 Nouveau rôle des kinases du point de contrôle

Le mécanisme moléculaire qui sous-tend la régulation des histones au niveau transcriptionnel a été abordé en détail dans le chapitre II afin de comprendre davantage comment la cellule réprime les gènes d'histones en réponse aux agents

génomiques pour prévenir les effets néfastes d'un excès d'histones. L'un des objectifs principaux de la thèse était d'explorer le rôle des kinases du point de contrôle dans la répression des gènes d'histones déclenchée par la présence de dommages à l'ADN. Avant l'initiation de ce projet de recherche, il était connu que les gènes d'histones étaient régulés de façon dépendante du cycle cellulaire et que l'abondance des ARNm d'histones chutait drastiquement en présence de dommage à l'ADN en phase S (Hereford *et al.* 1981). Les protéines Hir/Hpc furent par la suite découvertes comme ayant une fonction dans la répression des gènes d'histones dans le cycle cellulaire (Osley and Lycan 1987, Xu *et al.* 1992, Sherwood *et al.* 1993). Le seul lien établi et connu à l'époque entre le point de contrôle intra-S et le complexe HIR provenait de deux études de phospho-protéomique à grande échelle du laboratoire du Dr. Huilin Zhou qui avait identifié la sous-unité Hpc2 du complexe HIR comme substrat potentiel de la kinase du point de contrôle Rad53 (Smolka *et al.* 2007, Chen *et al.* 2010). Nous avons tout d'abord validé ce résultat en confirmant que les kinases du point de contrôle Mec1/Tel1 et Rad53 sont bel et bien impliquées dans la répression des gènes d'histones en démontrant que des souches *mec1Δ tel1Δ sml1Δ* ou *rad53Δ sml1Δ* possèdent, en réponse au dommage à l'ADN, des niveaux de transcrits d'histones considérablement plus élevés que ceux observés chez une souche WT (Figures II.1 et II.2). Cet effet est clairement lié à un défaut de répression transcriptionnelle, plutôt qu'à la régulation post-transcriptionnelle des ARNm d'histones, car il est également observé lorsqu'un promoteur de gène d'histone est fusionné à un gène qui n'encode pas une histone (figure II.S1).

Un autre objectif était d'identifier la ou les kinase(s) du point de contrôle qui phosphoryle(nt) le complexe HIR. Un résultat intéressant mais prévisible est que l'activité kinase de Rad53 est requise pour réprimer les gènes d'histones. De plus, nous avons montré par spectrométrie de masse que Rad53 phosphoryle Hpc2 *in vitro* et *in vivo* pour permettre la répression des gènes d'histones en réponse aux agents génotoxiques. Les résultats *in vivo* obtenus en SM suggèrent que la phosphorylation

d'Hpc2 est dépendante de Mec1/Tel1 et de Rad53 en réponse au dommage à l'ADN suite au traitement avec les agents génotoxiques. Les résultats *in vitro* obtenus en SM suggèrent fortement que le domaine catalytique de Rad53 est requis pour phosphoryler Hpc2, mais on ne peut pas exclure la possibilité qu'une autre protéine, telle que Dun1, puisse être impliquée directement dans la phosphorylation d'Hpc2 pour réprimer les gènes d'histones. Un essai kinase *in vitro* avec Dun1 et le substrat Hpc2 pourrait potentiellement indiquer un ou des sites de phosphorylation d'Hpc2 phosphorylé(s) par Dun1. Une autre expérience intéressante à réaliser, afin de déterminer un rôle pour Dun1 dans la répression des gènes d'histones induite par les agents génotoxiques, serait d'observer l'abondance des transcrits d'ARNm d'histones en présence d'HU ou de MMS par transcription inverse suivi d'un PCR quantitatif (RT-qPCR) dans une souche *dun1Δ* et WT. Advenant le cas où Dun1 est impliquée dans la répression des gènes d'histones, le résultat attendu pour la souche *dun1Δ* serait une perte de répression des transcrits d'histones en réponse au HU ou MMS comparativement à la souche WT.

À notre grande surprise, aucune autre sous-unité du complexe HIR (Hir1, Hir2 ou Hir3) n'était phosphorylée dans nos analyses de spectrométrie de masse ou celles effectuées par le laboratoire du Dr. Huilin Zhou (Smolka *et al.* 2007, Chen *et al.* 2010). Hpc2 semble donc être la protéine clef pour la régulation du complexe HIR et nous avons donc concentré nos efforts sur son étude en profondeur. Nos résultats présentés au chapitre II nous ont permis de mettre à jour un nouveau mécanisme de régulation transcriptionnelle des histones qui implique les kinases du point de contrôle intra-S et le complexe HIR qui agissent de concert dans une même voie de signalisation cellulaire.

V.1.2 La régulation du complexe HIR se fait via Hpc2

Hpc2 est une protéine chargée positivement qui possède une région riche en résidus sérine et thréonine située entre les acides aminés 305 à 334 nommée la région ST (Sérine/Thréonine). Nous avons démontré que la mutation de ces résidus en alanine, afin d'empêcher leur phosphorylation, mène à des niveaux d'ARNm d'histones anormalement élevés en présence d'HU. En contrepartie, les mutants Hpc2 sérine-alanine que nous avons générés dans la région ST demeurent stables en présence d'HU bien qu'Hpc2 soit instable dans une souche *rad53Δ sml1Δ* traitée au HU. Ce résultat est étonnant, puisque ces mutants présentent un défaut de répression marqué des gènes d'histones. Une explication plausible serait que la phosphorylation de la région ST est nécessaire au recrutement du complexe RSC aux promoteurs des gènes d'histones lorsque la réplication est affectée par les agents génotoxiques et que d'autres résidus d'Hpc2 en dehors de la région ST seraient nécessaires à sa stabilité afin d'éviter sa dégradation et que la phosphorylation Rad53-dépendante de résidus d'Hpc2 situés en dehors de la région ST soit nécessaire pour stabiliser la protéine Hpc2 en réponse à HU ou MMS. Toutefois, nous avons utilisé dans nos essais kinases *in vitro* une protéine Hpc2 recombinante tronquée (acides aminés 32 à 352) pour augmenter le rendement d'expression et réduire l'agrégation d'Hpc2 exprimée chez *E. coli*; la précipitation de la protéine étant observée avec Hpc2 pleine longueur (données non incluses). Étant donné que cette protéine tronquée ne possédait pas les domaines CDII et CDIII (domaine HRD), un autre point intéressant à examiner serait de déterminer si Rad53 possède la capacité de phosphoryler Hpc2 *in vitro* et *in vivo* aux domaines CDII et/ou CDIII et ainsi une telle phosphorylation pourrait permettre de stabiliser son substrat *in vivo* en HU.

Nous avons également démontré par immunoprécipitation de la chromatine que les mutations d'Hpc2 à la région ST (jusqu'à 15 sérines/thréonines mutées en alanines/valines) ne perturbent pas la localisation de la protéine au promoteur du gène

d'histone *HTA1* quoi qu'elles réduisent considérablement le recrutement du complexe RSC aux promoteurs des gènes d'histones. Un fait intéressant est qu'une souche *hpc2Δ* abolit le recrutement de Rtt106 aux promoteurs des gènes d'histones (Fillingham *et al.* 2009). Une possibilité attrayante serait que Rtt06 qui interagit directement avec les complexe RSC et HIR (Fillingham *et al.* 2009, Ferreira *et al.* 2011) fasse office d'intermédiaire facilitant le recrutement du complexe RSC et que la phosphorylation d'Hpc2 à la région ST soit requise pour la formation du complexe HIR/Rtt106. En conclusion, ces résultats suggèrent que le mécanisme moléculaire sous-jacent à la répression des gènes d'histones en réponse au dommage à l'ADN se produit via Hpc2 qui semble être la protéine centrale, puisqu'elle est la seule protéine du complexe HIR phosphorylée directement par Rad53.

V.1.3 Les gènes d'histones sont réprimés en milieu de phase S

Il est bien établi que les gènes d'histones sont réprimés majoritairement en G1 et G2/M du cycle cellulaire (Hereford *et al.* 1981, Osley and Lycan 1987, Xu *et al.* 1992). Le terme phase S normale réfère aux cellules qui progressent dans le cycle cellulaire sans perturbations tels les agents génotoxiques qui bloquent la réplication de l'ADN et activent le point de contrôle intra S. Durant une phase S normale, le pic d'abondance optimal des ARNm d'histones est observée environ 30 minutes après la relâche de cellules WT de levure en phase S (Hereford *et al.* 1982, Eriksson *et al.* 2011). On croyait jusqu'à récemment que l'entrée en jeu du complexe HIR ne survenait exclusivement qu'après la fin d'une phase S normale ou lors de dommage à l'ADN.

Nos résultats du chapitre II (figure II.6C) qui indiquent qu'Hpc2 est stable en milieu de phase S sont inattendus, car durant une phase S normale, la cellule dépose rapidement des histones néo-synthétisées derrière toutes les fourches de réplication d'origines précoces et tardives. Il n'est pas intuitif de penser que la cellule stabilise

Hpc2 et réprime les gènes d'histones avant la fin de la phase S. De plus, l'activité kinase de Rad53 est très faible en absence de dommage à l'ADN durant une phase S normale (Hoch *et al.* 2013). Même si l'activité kinase de Rad53 dans une phase S normale est faible, celle-ci n'est pas nulle, car le domaine SCD1 de Rad53, lui, est requis pour phosphoryler Dun1 et dégrader Sml1 pendant la réplication de l'ADN (Hoch *et al.* 2013). La dégradation de Sml1 est nécessaire pour permettre d'augmenter la concentration des dNTPs aux niveaux requis pour la réplication de l'ADN (Zhao and Rothstein 2002). La caractérisation en profondeur d'un possible rôle pour Dun1 dans la répression des gènes d'histones dans une phase S normale est d'une importance capitale. Dun1 phosphoryle Hpc2 à la sérine 389 *in vivo* en réponse au MMS (Chen *et al.* 2010). Une hypothèse attrayante serait que Dun1 module la dégradation d'Hpc2 par sa phosphorylation également dans une phase S normale. Il serait intéressant de déterminer si cette phosphorylation permet ou empêche la répression des gènes par Hpc2. Une autre avenue à considérer serait qu'un autre mécanisme alternatif inconnu qui ne dépend pas des kinases du point de contrôle régulerait le complexe HIR durant une phase S normale et que ce mécanisme soit dépendant du niveau d'histones libres non incorporées dans la chromatine en duplication. Cette hypothèse demande à être adressée et sera donc discutée en détail dans les perspectives à la section V.3.1.

V.1.4 La transcription des gènes d'histones à la transition G1/S corrèle avec l'instabilité de la protéine Hpc2

Hereford et ses collègues proposaient que le début de la transcription des gènes d'histones a lieu avant initiation de la réplication de l'ADN, c'est-à-dire entre le point d'arrêt défini par des mutations thermosensibles (Ts⁻) dans le gène CDC4 (une ubiquitine ligase dont l'action est requise au point START du cycle cellulaire) et peu après le point d'arrêt défini par une mutation Ts⁻ dans le gène CDC7 (une kinase dont l'action est requise pour amorcer la réplication de l'ADN). Leurs résultats suggéraient

que la transcription des gènes d'histones est réprimée durant la phase S (Hereford *et al.* 1982) et concordent avec nos données montrant qu'Hpc2 est instable durant la transition G1/S et redevient stable avant la fin d'une phase S normale. Deux possibilités pourraient expliquer l'instabilité d'Hpc2 observé dans nos résultats. Hpc2 pourrait être intrinsèquement instable, mais fortement synthétisée en G1, de sorte que, malgré son instabilité constitutive, Hpc2 soit quand même détectable en G1 par immunoblot. Durant la transition G1/S jusqu'au milieu de la phase S, la synthèse de nouvelles molécules d'Hpc2 cesserait et donc l'instabilité constitutive d'Hpc2 entraînerait la disparition de la protéine pour permettre la transcription des gènes d'histones. Le second scénario serait qu'Hpc2 est une protéine dont la dégradation est conditionnelle et que sa dégradation ne soit possible qu'à certains stades du cycle cellulaire où une forte transcription des gènes d'histones est requise.

Une autre possibilité captivante provenant du résultat de la figure II.6.B suggérerait un mécanisme potentiel de synthèse/dégradation, c'est-à-dire une synthèse constitutive pour Hpc2 et sa dégradation par le protéasome lorsque la répression des gènes d'histones n'est pas requise par exemple en G1/S. Les résultats de la figure II.6 ne permettant pas de distinguer entre ces deux possibilités, l'étude de la synthèse de nouvelles molécules d'Hpc2 dans les différentes phases du cycle cellulaire pourrait nous éclairer à ce sujet. L'éventualité qu'Hpc2 soit ubiquitinée à la transition G1/S à l'aide de l'ubiquitine ligase SCF^{Cdc4} en vue de promouvoir sa dégradation est à considérer. Cette hypothèse est attrayante car le rôle de SCF^{Cdc4} pour permettre le passage des cellules de G1 en phase S est bien établi (Hereford *et al.* 1982). Cependant, il est aussi possible que Cdc4 ne joue pas de rôle direct dans la dégradation d'Hpc2 et que les cellules doivent simplement franchir le point d'arrêt *cdc4* avant qu'Hpc2 ne puisse être dégradée.

V.2 Perspectives : la régulation transcriptionnelle des histones

V.2.1 Le signal qui initie la régulation négative des histones

Trois mécanismes de surveillance des histones s'assurent de réprimer la transcription des gènes d'histones, de dégrader rapidement les ARNm d'histones et de dégrader les protéines d'histones lors d'une accumulation des histones non incorporées dans la chromatine. Effectivement, si on interfère simultanément avec les effecteurs de plus d'un niveau de régulation des histones, les conséquences qui en découlent sont irréparables. En effet, des analyses de mutations génétiques montrent que les souches *trf4Δ rad53Δ* et *trf4Δ asf1Δ* sont synthétiques létales tandis que la souche *trf4Δ hir1Δ* est très malade à la suite d'une inactivation simultanée de plus d'un mécanisme de surveillance de l'excès d'histones (transcriptionnel, post-transcriptionnel et post-traductionnel) (Reis and Campbell 2007). Cependant, la délétion d'un ou de plusieurs membres du complexe HIR ne rend pas la cellule sensible aux agents génotoxiques (A. Gunjan, communication personnelle) ce qui renforce l'idée que les autres mécanismes de régulation des histones prennent la relève et que les ARNm d'histones peuvent être rapidement dégradés afin de prévenir les conséquences néfastes de l'excès d'histones provoqué par le ralentissement soudain de la réplication induit par le HU ou MMS.

Une direction intéressante à examiner serait l'étude de la localisation cellulaire des ARNm d'histones lorsqu'un excès d'histones est détecté en réponse au dommage à l'ADN dans une souche de levure dont une des protéines Hir/Hpc est absente. Une éventualité fascinante serait qu'un facteur impliqué dans l'export nucléaire des ARNm d'histones interagisse avec des protéines directement impliquées dans la dégradation des ARNm d'histones et ainsi dégrader les ARNm d'histones destinés à être traduits, ce qui permettrait la dégradation des ARNm et ce, avant même qu'ils ne soient exportés du noyau cellulaire. Ce mécanisme potentiel de régulation semble plausible car Trf4 fait partie de l'exosome nucléaire, un complexe multi-protéique

impliqué dans la dégradation d'ARN défectueux (voir section I.2.3). Il serait intéressant de déterminer si les ARNm d'histones sont exportés dans le cytoplasme dans une souche *hir1Δ* en HU. Une façon d'étudier le transport des ARNm d'histones serait par la création d'un ARNm d'histone qui contient, à la suite de sa région codante, une tige et boucle d'ARN (*hairpin*). Cette boucle est reconnue par une protéine fusionnée à la GFP qui lie spécifiquement la structure d'ARN en tige et boucle (Brodsky and Silver 2002). Il serait donc possible d'étudier la localisation de l'ARNm d'histone par microscopie à fluorescence. Afin d'étudier le transit des ARNm d'histones du noyau au cytoplasme, il serait également intéressant d'utiliser une souche de levure dont le promoteur de *HIR1* est inductible au galactose et de synchroniser les cellules en G1 en présence de glucose, ce qui réprimerait *HIR1* qui est sous le contrôle du promoteur inductible et permettrait d'observer par microscopie une probable accumulation d'ARNm d'histones dans le noyau causée par un défaut de répression transcriptionnelle comparativement à la souche WT. Ces résultats nous donneraient des pistes supplémentaires sur le mécanisme de dégradation des ARNm d'histones.

Dans un autre ordre d'idées, une question cruciale qui demeure à être adressée est comment la cellule peut détecter une accumulation anormale d'histones pendant la réplication de l'ADN? Une partie de la réponse pourrait venir du fait que le complexe HIR participe à plus d'un processus en lien avec la régulation de la chromatine notamment dans l'assemblage des nucléosomes réplication-indépendant. Nous suggérons que le complexe HIR exerce un *feedback* négatif aux promoteurs des gènes d'histones de par sa liaison avec les histones en excès. En effet, l'accumulation d'histones aurait comme conséquence de saturer les chaperones réplication dépendante, et par la suite de saturer les chaperones réplication-indépendante dont fait partie le complexe HIR. La saturation du complexe HIR par les histones en phase S pendant la réplication de l'ADN serait le signal signifiant aux cellules un excès d'histones. En d'autres mots, si la synthèse d'histones est constante et que la synthèse

totale d'ADN décroît progressivement durant la progression à travers la phase S (en raison d'une diminution du nombre de fourches de réplication), une conséquence inévitable sera la saturation éventuelle des chaperones d'histones. Récemment, chez l'humain, la région d'UBN1 qui lie physiquement l'histone H3.3 a été identifiée par des études structurales et cette région est conservée chez la levure (R. Marmorstein, communication personnelle, 02 octobre 2014). Cette région est 575-FIDDS-579 et est contenue dans le domaine CDIII d'Hpc2. Une hypothèse intéressante serait que la phosphorylation de la sérine 578 par Rad53 pourrait augmenter l'affinité de cette région pour H3 et que la liaison d'Hpc2 à H3 contribuerait à la fois à stabiliser Hpc2 en réponse au dommage à l'ADN et à réprimer les gènes d'histones en déposant des complexes H3/H4 à ces promoteurs. Par conséquent, en présence d'un excès d'histones, le complexe HIR doit se lier aux histones H3 chez *S. cerevisiae* en phase S afin de permettre la répression des gènes d'histones par ce même complexe (figure V.1). En supposant que chez la levure l'interaction entre l'histone H3 et Hpc2 soit abolie en introduisant des mutations ponctuelles de cette région d'Hpc2, nous pourrions tester cette hypothèse par RT-qPCR des transcrits d'histones afin de voir s'il y a accumulation des ARNm d'histones en réponse au dommage à l'ADN ou même en phases G1 et/ou G2. Il serait également important de mesurer par ChIP la densité d'ARNPII sur les gènes d'histones dans les cellules WT ou celles portant des mutations qui empêchent Hpc2 de se lier à H3.3.

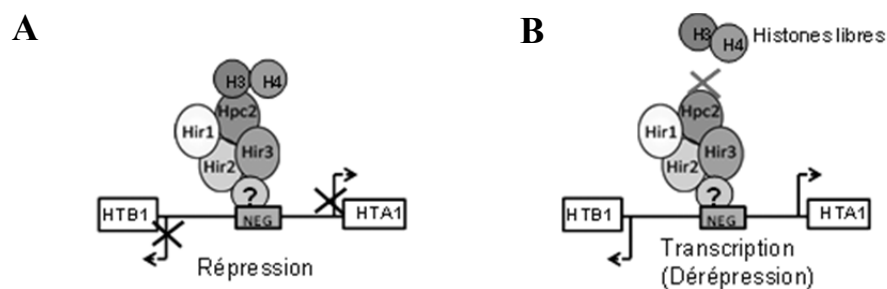


Figure V.1. Le signal de détection de l'excès d'histones passerait par le complexe HIR (A) Schéma montrant que le complexe HIR aux promoteurs des gènes d'histones doit se lier avec les histones H3-H4 pour réprimer les gènes d'histones. (B) L'absence de liaison entre le complexe HIR et les histones H3-H4 empêche la répression transcriptionnelle des gènes d'histones.

De plus, on ne peut pas exclure que le complexe HIR dépose des histones spécifiquement aux promoteurs des gènes d'histones lorsque la réplication est ralentie en réponse aux agents génotoxiques ou ralentie vers la fin d'une phase S normale. Il est possible de vérifier cette dernière spéculation en examinant la densité des histones aux promoteurs des gènes d'histones par CHIP dans une souche où le mutant Hpc2 ne possède plus la capacité de lier les histones H3. Si cette hypothèse s'avère correcte, on s'attendrait à voir une diminution de l'abondance des histones H3 aux promoteurs des gènes d'histones. L'accessibilité de Spt10 aux promoteurs des gènes d'histones pourrait également être examinée par ChIP dans cette souche mutante d'Hpc2 lors de dommage à l'ADN en phase S, puisqu'une chromatine répressive a comme fonction de bloquer l'accès aux facteurs de transcription. Il semble plausible que Spt10 soit plus abondant aux promoteurs des gènes d'histones en absence de répression.

V.3 Le patron global des modifications post-traductionnelles des histones suite aux traitements par les inhibiteurs d'histones désacétylases

Dans les chapitres III et IV de ma thèse, j'ai porté mes recherches sur l'étude de l'acétylation des histones induite par les inhibiteurs d'histones désacétylases dans les cellules humaines, dans le but de déterminer l'étendue des effets de ces inhibiteurs sur la désacétylation des histones. Notre objectif principal était d'établir le profil d'acétylation des histones à partir de leur masse intacte ainsi que d'obtenir la stœchiométrie précise d'acétylation des histones.

V.3.1 Abondance de l'acétylation des histones H3 et H4 par les HDACi

Notre étude des inhibiteurs de désacétylases d'importance clinique a permis de mettre en évidence un patron d'acétylation des histones. Étonnamment, nos analyses des histones purifiées par séparation en chromatographie liquide suivi de la spectrométrie de masse (LC-MS) ont démontré que les histones H2A et H2B présentent peu

d'acétylation suite aux traitements avec les HDACi (Figure III.2). Nous avons donc concentré nos recherches sur les histones H3 et H4 qui apparaissent hautement acétylées après traitement avec le SAHA et le MS-275. Nous avons identifié par spectrométrie de masse en tandem (MS/MS) que l'histone H3 est fortement hyper-acétylée aux lysines 9, 14, 18 et 23 et que l'histone H4 est hyper-acétylée aux lysines 5, 8, 12, and 16 après traitement au SAHA ou MS-275 (Figure III.3a-b). Ces HDACi ne sont pas sélectifs à une seule enzyme HDAC, il n'est donc pas surprenant d'observer de multiples résidus affectés par les traitements (Zheng *et al.* 2008). Malheureusement, cibler une HDAC en particulier est un défi de taille car plusieurs de ces enzymes ont un mécanisme d'action similaire d'où l'effet global d'hyper-acétylation des histones traitées aux HDACi observé dans notre étude. De plus, faire la comparaison de la stœchiométrie des PTM des histones entre différentes lignées cellulaires cancéreuses et normales semble être de mise pour des travaux futurs afin d'établir un possible patron différentiel d'acétylation qui se démarquerait dans les cellules cancéreuses.

Parmi les PTM observées suite aux traitements avec le SAHA et le MS-275, nous avons identifié pour la première fois l'hyper-méthylation de l'histone H3 aux lysines 27 et 36 qui sont di-méthylées. Il est assez surprenant que ces deux modifications antagonistes soient présentes sur le même peptide sachant que la méthylation (me) de H3 lysine 27 (H3K27me) est une marque présente aux gènes réprimés et que H3K36me est plutôt une PTM aux gènes transcriptionnellement actifs (Bannister *et al.* 2005, Pasini *et al.* 2010). Il est d'autant plus étonnant que l'abondance du peptide $K_{27}(me_2)SAPATGGVK_{36}(me_2)_{K37}(pr)PHR$ doublement méthylé augmente de 2 à 4 fois en présence de SAHA et de MS-275 respectivement. Une hypothèse à envisager sur l'augmentation de la méthylation serait que le traitement aux HDACi affecte une HDAC qui interagit fonctionnellement avec une histone déméthylase. En effet, lorsque des cellules cancéreuses du sein sont traitées avec un HDACi, une accumulation de la méthylation de H3K4 mono- et -di-méthylé, des substrats de la déméthylase LSD1 est observée (Huang *et al.* 2012). Ce résultat suggère un possible

lien fonctionnel entre une déméthylase et une histone désacétylase (Vasilatos *et al.* 2013). Toutefois, la signification biologique de cette découverte demeure actuellement inconnue.

V.3.2 Spécificité des anticorps contre l'histone H3 lysine 56 acétylée

L'acétylation de l'histone H3 sur la lysine 56 est une modification ayant de multiples fonctions par exemple dans l'assemblage des nucléosomes en phase S, la réparation de l'ADN et la transcription chez la levure. C'est pourquoi nous nous y sommes intéressés dans notre étude de spectrométrie de masse. La propionylation des histones purifiées a été effectuée afin d'empêcher la trypsine de couper le peptide à une lysine 56 non modifiée *in vivo* (Garcia *et al.* 2004, Garcia *et al.* 2007, Drogaris *et al.* 2008). De cette manière, il est possible de déterminer la stoechiométrie d'acétylation de H3K56 sur un peptide natif YQKacSTELLIR. Donc la dérivation des peptides avec l'anhydride propionique, suivi des analyses en spectrométrie de masse basées sur plusieurs peptides contrôles comme sujets de normalisation, nous ont permis de détecter H3K56Ac *in vivo* à une très faible abondance (Figures III.4-5). Ce résultat était déconcertant puisque plusieurs autres groupes de recherche avaient identifié cette PTM par immunoblot chez l'humain. Nous avons par conséquent démontré que les anticorps anti-acétyl spécifique pour les PTM des histones ne sont pas du tout spécifiques contre H3K56Ac (Figure III.6). Ce résultat est alarmant, surtout lorsque ces anticorps sont utilisés en histologie et proposés comme biomarqueurs des cancers (Chapitre IV et (Das *et al.* 2009)). Sans nier la vraisemblance des résultats des études antérieures, une hypothèse plausible serait que chez l'humain, H3K9Ac aurait une fonction similaire à H3K56Ac chez la levure. L'implication de H3K9Ac chez l'humain demeure à être élucidée. Finalement, nos résultats supportent l'idée que H3K56Ac n'est pas un bon biomarqueur du cancer.

V.4 Perspectives : acétylation des histones

V.4.1 H3K9Ac ou H3K56Ac, telle est la question!

L'acétylation de H3K9 est 800 fois plus élevée que celle de H3K56 chez les cellules K562 après traitement avec le SAHA (Chapitre III). En vue d'établir la fonction biologique de H3K9Ac ou de mettre en évidence la PTM comme biomarqueur du cancer plutôt que H3K56Ac, il est d'une importance capitale d'utiliser un anticorps anti-acétyl spécifique. Malheureusement, la plupart de ceux déjà disponibles commercialement ne le sont pas (figure III.6). De plus, j'ai poussé mon enquête en interrogeant trois compagnies bien connues qui génèrent un anticorps monoclonal anti-acétyl K9. Malheureusement, il n'a pas été possible de prouver hors de tout doute la spécificité de leurs anticorps par des données poussées sur la spécificité et seulement des données de base étaient disponibles, bien qu'une des compagnies est demeurée honnête en précisant que leur anticorps H3K9Ac n'avait pas bien été caractérisé et qu'ils n'avaient pas testé ce dernier en immunohistochimie (Abcam, Qiagen et Epitomics, Communication personnelle, 25 mars 2013). De plus, les données de base disponibles sur ces anticorps anti-H3K9Ac sont des immunoblots d'histones purifiées ayant été traitées (ou non) avec un HDACi (*e.g.* Butyrate de sodium, Trichostatin A). Il est évident que le résultat attendu et observé est en fait une augmentation de l'acétylation d'une ou de plusieurs lysines, cependant ce résultat n'indique aucunement que la lysine 9 soit exclusivement et spécifiquement reconnue par l'anticorps. De plus, on ne peut exclure la possibilité que cet anticorps réagisse de façon croisée avec d'autres protéines retrouvées dans un extrait cellulaire total *in vivo* ou bien dans des micro-puces de tissus cancéreux en immunohistochimie. Générer un anticorps spécifique contre un résidu acétylé précis sur l'histone H3 est coûteux en temps et en argent, d'où probablement le fait que plusieurs laboratoires de recherche ne possèdent pas les ressources nécessaires pour produire leur propre anticorps anti-acétyl spécifique et de procéder à la panoplie de contrôles pour s'assurer de sa spécificité de reconnaissance. C'est pourquoi il est crucial dans nos recherches futures de générer un anticorps spécifique contre H3K9Ac. Quoique la tâche puisse

être ardue, il n'est pas impossible de produire un tel anticorps. En passant l'anticorps nouvellement produit à plusieurs reprises dans une colonne d'exclusion qui contient les peptides H3K4Ac, H3K27Ac et H3K56Ac, on pourrait probablement obtenir un anticorps avec une spécificité accrue. Ensuite, il serait possible de vérifier sa spécificité en transfectant dans des cellules humaines un plasmide qui possède le gène de l'histone H3.1 muté à la lysine 9 pour une arginine (H3.1K9R) et possédant une étiquette moléculaire afin de le distinguer de la protéine H3.1 endogène par immunoblot (migration plus lente sur gel SDS-PAGE). Nous pourrions également tester la réaction croisée avec un plasmide H3.1K27R ou H3.1K56R. Finalement, un essai de peptide compétiteur réalisé au chapitre III serait à envisager. Pour terminer, l'abondance du peptide H3K9Ac est de 5 à 17 fois plus élevée dans les cellules K562 traitées au SAHA et MS-275 respectivement que dans les cellules non traitées. À l'aide d'un anticorps dont la spécificité contre anti-H3K9Ac aurait été vérifiée, il serait intéressant d'effectuer une immunoprécipitation de la chromatine suivi d'un séquençage génomique (ChIP-Seq) afin d'établir s'il y a une tendance qui se dessine sur la localisation génomique des histones H3K9Ac dans plusieurs lignées cellulaires cancéreuses et normales.

V.5 Conclusion

Pour conclure, nous avons montré que les kinases du point de contrôle sont impliquées dans la répression des gènes d'histones en réponse au dommage à l'ADN, en régulant Hpc2 du complexe HIR. En effet, la phosphorylation d'Hpc2 par la kinase Rad53 est requise pour réprimer les gènes d'histones et est également essentielle pour le recrutement aux promoteurs des gènes d'histones du complexe RSC dont la présence sur les promoteurs des gènes d'histones corrèle avec leur répression. De manière inattendue, nous avons démontré pour la première fois qu'Hpc2 redevient stable "avant" la fin de la phase S, vraisemblablement afin de limiter la quantité d'histones néo-synthétisées libres générées lorsque la synthèse totale d'ADN diminue rapidement en fin de phase S. Nos résultats soulèvent une question fascinante quant au mécanisme par lequel les cellules détectent la présence d'histones libres et stabilisent la protéine Hpc2 afin de permettre au complexe de rapidement réprimer la transcription des gènes d'histones.

De plus, cette thèse porte un regard nouveau sur les inhibiteurs de désacétylases et de leurs effets sur les modifications post-traductionnelles des histones. Nous avons atteint notre objectif qui était de caractériser le profil d'acétylation des histones suite aux traitements des HDACi dans les cellules normales et cancéreuses. Nous avons découvert avec stupéfaction que H3K56Ac est très peu abondant dans les cellules cancéreuses contrairement aux données de la littérature. L'utilisation de micropuces tissulaires de différents types de cancers afin d'évaluer le potentiel d'anticorps contre l'acétylation des histones comme un potentiel biomarqueur, nous a permis de découvrir que l'anticorps testé était incapable de distinguer les tissus cancéreux et normaux. De plus, sachant que les anticorps ne sont pas spécifiques pour H3K56Ac, le rôle de cette marque épigénétique chez l'humain demeure à être redéfini.

Pour terminer, l'ensemble de ces résultats amène une meilleure compréhension sur les mécanismes moléculaires en lien avec la régulation transcriptionnelle et post-traductionnelle des histones et sur comment la cellule prévient l'instabilité génomique, en plus d'apporter de nouvelles pistes de compréhension en vue d'améliorer nos outils thérapeutiques et de détection du cancer.

Chapitre VI

Sources documentaires

Chapitre VI Sources documentaires

1. Aboussekhra, A., J. E. Vialard, D. E. Morrison, M. A. de la Torre-Ruiz, L. Cernakov, F. Fabre and N. F. Lowndes (1996). "A novel role for the budding yeast *RAD9* checkpoint gene in DNA damage-dependent transcription." *EMBO J.* 15: 3912-3922.
2. Abramova, M. V., T. V. Pospelova, F. P. Nikulenkov, C. M. Hollander, A. J. Fornace, Jr. and V. A. Pospelov (2006). "G1/S arrest induced by histone deacetylase inhibitor sodium butyrate in E1A + Ras-transformed cells is mediated through down-regulation of E2F activity and stabilization of beta-catenin." *J Biol Chem* 281(30): 21040-21051.
3. Adams, P. D. (2007). "Remodeling of chromatin structure in senescent cells and its potential impact on tumor suppression and aging." *Gene* 397(1-2): 84-93.
4. Adkins, M. W., S. R. Howar and J. K. Tyler (2004). "Chromatin disassembly mediated by the histone chaperone Asf1 is essential for transcriptional activation of the yeast *PHO5* and *PHO8* genes." *Mol Cell* 14(5): 657-666.
5. Adkins, N. L., M. Watts and P. T. Georgel (2004). "To the 30-nm chromatin fiber and beyond." *Biochim Biophys Acta* 1677(1-3): 12-23.
6. Ahmad, K. and S. Henikoff (2002). "The histone variant H3.3 marks active chromatin by replication-independent nucleosome assembly." *Mol Cell* 9(6): 1191-1200.
7. Ait-Ahmed, O., B. Bellon, M. Capri, C. Joblet and M. Thomas-Delaage (1992). "The yemanuclein-alpha: a new *Drosophila* DNA binding protein specific for the oocyte nucleus." *Mech Dev* 37(1-2): 69-80.
8. Allfrey, V. G., R. Faulkner and A. E. Mirsky (1964). "Acetylation and Methylation of Histones and Their Possible Role in the Regulation of Rna Synthesis." *Proc Natl Acad Sci U S A* 51: 786-794.
9. Amin, A. D., N. Vishnoi and P. Prochasson (2013). "A global requirement for the HIR complex in the assembly of chromatin." *Biochim Biophys Acta* 1819(3-4): 264-276.
10. Annunziato, A. T. (2013). "Assembling chromatin: the long and winding road." *Biochim Biophys Acta* 1819(3-4): 196-210.
11. Anoopkumar-Dukie, S., J. B. Carey, T. Conere, E. O'Sullivan, F. N. van Pelt and A. Allshire (2005). "Resazurin assay of radiation response in cultured cells." *Br J Radiol* 78(934): 945-947.

12. Aparicio, O. M., B. L. Billington and D. E. Gottschling (1991). "Modifiers of position effect are shared between telomeric and silent mating-type loci in *S. cerevisiae*." *Cell* 66(6): 1279-1287.
13. Aravind, L. and D. Landsman (1998). "AT-hook motifs identified in a wide variety of DNA-binding proteins." *Nucleic Acids Res* 26(19): 4413-4421.
14. Au, W. C., M. J. Crisp, S. Z. DeLuca, O. J. Rando and M. A. Basrai (2008). "Altered dosage and mislocalization of histone H3 and Cse4p lead to chromosome loss in *Saccharomyces cerevisiae*." *Genetics* 179(1): 263-275.
15. Avery, O. T., C. M. Macleod and M. McCarty (1944). "Studies on the Chemical Nature of the Substance Inducing Transformation of Pneumococcal Types : Induction of Transformation by a Desoxyribonucleic Acid Fraction Isolated from Pneumococcus Type Iii." *J Exp Med* 79(2): 137-158.
16. Aye, Y., M. Li, M. J. Long and R. S. Weiss (2014). "Ribonucleotide reductase and cancer: biological mechanisms and targeted therapies." *Oncogene*.
17. Badis, G., E. T. Chan, H. van Bakel, L. Pena-Castillo, D. Tillo, K. Tsui, C. D. Carlson, A. J. Gossett, M. J. Hasinoff, C. L. Warren, M. Gebbia, S. Talukder, A. Yang, S. Mnaimneh, D. Terterov, D. Coburn, A. Li Yeo, Z. X. Yeo, N. D. Clarke, J. D. Lieb, A. Z. Ansari, C. Nislow and T. R. Hughes (2008). "A library of yeast transcription factor motifs reveals a widespread function for Rsc3 in targeting nucleosome exclusion at promoters." *Mol Cell* 32(6): 878-887.
18. Balaji, S., L. M. Iyer and L. Aravind (2009). "Hpc2 and ubinuclein define a novel family of histone chaperones conserved throughout eukaryotes." *Mol Biosyst* 5(3): 269-275.
19. Bandhu, A., J. Kang, K. Fukunaga, G. Goto and K. Sugimoto (2014). "Ddc2 mediates Mec1 activation through a Ddc1- or Dpb11-independent mechanism." *PLoS Genet* 10(2): e1004136.
20. Bannister, A. J., R. Schneider, F. A. Myers, A. W. Thorne, C. Crane-Robinson and T. Kouzarides (2005). "Spatial distribution of di- and tri-methyl lysine 36 of histone H3 at active genes." *J Biol Chem* 280(18): 17732-17736.
21. Banumathy, G., N. Somaiah, R. Zhang, Y. Tang, J. Hoffmann, M. Andrade, H. Ceulemans, D. Schultz, R. Marmorstein and P. D. Adams (2009). "Human UBN1 is an ortholog of yeast Hpc2p and has an essential role in the HIRA/ASF1a chromatin-remodeling pathway in senescent cells." *Mol Cell Biol* 29(3): 758-770.
22. Battu, A., A. Ray and A. A. Wani (2011). "ASF1A and ATM regulate H3K56-mediated cell-cycle checkpoint recovery in response to UV irradiation." *Nucleic Acids Res* 39(18): 7931-7945.

23. Battu, A., A. Ray and A. A. Wani (2011). "ASF1A and ATM regulate H3K56-mediated cell-cycle checkpoint recovery in response to UV irradiation." *Nucleic Acids Res.*
24. Baumbach, L. L., F. Marashi, M. Plumb, G. Stein and J. Stein (1984). "Inhibition of DNA replication coordinately reduces cellular levels of core and H1 histone mRNAs: requirement for protein synthesis." *Biochemistry* 23: 1618-1625.
25. Baxevanis, A. D. and D. Landsman (1998). "Histone Sequence Database: new histone fold family members." *Nucleic Acids Res* 26(1): 372-375.
26. Becker, M., C. Baumann, S. John, D. A. Walker, M. Vigneron, J. G. McNally and G. L. Hager (2002). "Dynamic behavior of transcription factors on a natural promoter in living cells." *EMBO Rep.* 3: 1188-1194.
27. Beckers, T., C. Burkhardt, H. Wieland, P. Gimmnich, T. Ciossek, T. Maier and K. Sanders (2007). "Distinct pharmacological properties of second generation HDAC inhibitors with the benzamide or hydroxamate head group." *Int J Cancer* 121(5): 1138-1148.
28. Beelman, C. A., A. Stevens, G. Caponigro, T. E. LaGrandeur, L. Hatfield, D. M. Fortner and R. Parker (1996). "An essential component of the decapping enzyme required for normal rates of mRNA turnover." *Nature* 382(6592): 642-646.
29. Belotserkovskaya, R., S. Oh, V. A. Bondarenko, G. Orphanides, V. M. Studitsky and D. Reinberg (2003). "FACT facilitates transcription-dependent nucleosome alteration." *Science* 301(5636): 1090-1093.
30. Benson, L. J., Y. Gu, T. Yakovleva, K. Tong, C. Barrows, C. L. Strack, R. G. Cook, C. A. Mizzen and A. T. Annunziato (2006). "Modifications of H3 and H4 during chromatin replication, nucleosome assembly, and histone exchange." *J Biol Chem* 281(14): 9287-9296.
31. Beranek, D. T. (1990). "Distribution of methyl and ethyl adducts following alkylation with monofunctional alkylating agents." *Mutat Res* 231(1): 11-30.
32. Berloco, M., L. Fanti, A. Breiling, V. Orlando and S. Pimpinelli (2001). "The maternal effect gene, *abnormal oocyte (abo)*, of *Drosophila melanogaster* encodes a specific negative regulator of histones." *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 12126-12131.
33. Berndsen, C. E., B. N. Albaugh, S. Tan and J. M. Denu (2007). "Catalytic mechanism of a MYST family histone acetyltransferase." *Biochemistry* 46(3): 623-629.
34. Blackwell, C., K. A. Martin, A. Greenall, A. Pidoux, R. C. Allshire and S. K. Whitehall (2004). "The *S. pombe* HIRA-like protein, Hip1 is required for the periodic expression

- of histone genes and contributes to the function of complex centromeres." *Mol. Cell. Biol.* 24: 2204-2216.
35. Bloom, K. (1993). "The centromere frontier: kinetochore components, microtubule-based motility, and the CEN-value paradox." *Cell* 73(4): 621-624.
 36. Bloom, K. S. and J. Carbon (1982). "Yeast centromere DNA is in a unique and highly ordered structure in chromosomes and small circular minichromosomes." *Cell* 29(2): 305-317.
 37. Bolden, J. E., M. J. Peart and R. W. Johnstone (2006). "Anticancer activities of histone deacetylase inhibitors." *Nat Rev Drug Discov* 5(9): 769-784.
 38. Bonisch, C. and S. B. Hake (2012). "Histone H2A variants in nucleosomes and chromatin: more or less stable?" *Nucleic Acids Res* 40(21): 10719-10741.
 39. Bonner, W. M., R. S. Wu, H. T. Panusz and C. Muneses (1988). "Kinetics of accumulation and depletion of soluble newly synthesized histone in the reciprocal regulation of histone and DNA synthesis." *Biochemistry* 27: 6542-6550.
 40. Bots, M. and R. W. Johnstone (2009). "Rational combinations using HDAC inhibitors." *Clin Cancer Res* 15(12): 3970-3977.
 41. Bousset, K. and J. F. Diffley (1998). "The Cdc7 protein kinase is required for origin firing during S phase." *Genes Dev* 12(4): 480-490.
 42. Braig, M., S. Lee, C. Loddenkemper, C. Rudolph, A. H. Peters, B. Schlegelberger, H. Stein, B. Dorken, T. Jenuwein and C. A. Schmitt (2005). "Oncogene-induced senescence as an initial barrier in lymphoma development." *Nature* 436(7051): 660-665.
 43. Brewster, N. K., G. C. Johnston and R. A. Singer (2001). "A bipartite yeast SSRP1 analog comprised of Pob3 and Nhp6 proteins modulates transcription." *Mol Cell Biol* 21(10): 3491-3502.
 44. Brodsky, A. S. and P. A. Silver (2002). "Identifying proteins that affect mRNA localization in living cells." *Methods* 26(2): 151-155.
 45. Brown, S. W. (1966). "Heterochromatin." *Science* 151(3709): 417-425.
 46. Burgoyne, L. A., D. R. Hewish and J. Mobbs (1974). "Mammalian chromatin substructure studies with the calcium-magnesium endonuclease and two-dimensional polyacrylamide-gel electrophoresis." *Biochem J* 143(1): 67-72.

47. Byun, T. S., M. Pacek, M. C. Yee, J. C. Walter and K. A. Cimprich (2005). "Functional uncoupling of MCM helicase and DNA polymerase activities activates the ATR-dependent checkpoint." *Genes Dev* 19(9): 1040-1052.
48. Cairns, B. R. (2009). "The logic of chromatin architecture and remodelling at promoters." *Nature* 461(7261): 193-198.
49. Cairns, B. R., Y. J. Kim, M. H. Sayre, B. C. Laurent and R. D. Kornberg (1994). "A multisubunit complex containing the SWI1/ADR6, SWI2/SNF2, SWI3, SNF5, and SNF6 gene products isolated from yeast." *Proc Natl Acad Sci U S A* 91(5): 1950-1954.
50. Cairns, B. R., A. Schlichter, H. Erdjument-Bromage, P. Tempst, R. D. Kornberg and F. Winston (1999). "Two functionally distinct forms of the RSC nucleosome-remodeling complex, containing essential AT hook, BAH, and bromodomains." *Mol Cell* 4(5): 715-723.
51. Camahort, R., B. Li, L. Florens, S. K. Swanson, M. P. Washburn and J. L. Gerton (2007). "Scm3 is essential to recruit the histone h3 variant cse4 to centromeres and to maintain a functional kinetochore." *Mol Cell* 26(6): 853-865.
52. Camahort, R., M. Shivaraju, M. Mattingly, B. Li, S. Nakanishi, D. Zhu, A. Shilatifard, J. L. Workman and J. L. Gerton (2009). "Cse4 is part of an octameric nucleosome in budding yeast." *Mol Cell* 35(6): 794-805.
53. Campas-Moya, C. (2009). "Romidepsin for the treatment of cutaneous T-cell lymphoma." *Drugs Today (Barc)* 45(11): 787-795.
54. Campbell, S. G., M. Li Del Olmo, P. Beglan and U. Bond (2002). "A sequence element downstream of the yeast HTB1 gene contributes to mRNA 3' processing and cell cycle regulation." *Mol Cell Biol* 22(24): 8415-8425.
55. Campisi, J. (2005). "Senescent cells, tumor suppression, and organismal aging: good citizens, bad neighbors." *Cell* 120(4): 513-522.
56. Canavan, R. and U. Bond (2007). "Deletion of the nuclear exosome component RRP6 leads to continued accumulation of the histone mRNA HTB1 in S-phase of the cell cycle in *Saccharomyces cerevisiae*." *Nucleic Acids Res* 35(18): 6268-6279.
57. Celic, I., H. Masumoto, W. P. Griffith, P. Meluh, R. J. Cotter, J. D. Boeke and A. Verreault (2006). "The sirtuins hst3 and Hst4p preserve genome integrity by controlling histone h3 lysine 56 deacetylation." *Curr Biol* 16(13): 1280-1289.
58. Cha, R. S. and N. Kleckner (2002). "ATR homolog Mec1 promotes fork progression, thus averting breaks in replication slow zones." *Science* 297: 602-606.

59. Chabes, A., B. Georgieva, V. Domkin, X. Zhao, R. Rothstein and L. Thelander (2003). "Survival of DNA damage in yeast directly depends on increased dNTP levels allowed by relaxed feedback inhibition of ribonucleotide reductase." *Cell* 112: 391-401.
60. Chakravarthy, S., Y. J. Park, J. Chodaparambil, R. S. Edayathumangalam and K. Luger (2005). "Structure and dynamic properties of nucleosome core particles." *FEBS Lett* 579(4): 895-898.
61. Chargaff, E. (1950). "Chemical specificity of nucleic acids and mechanism of their enzymatic degradation." *Experientia* 6(6): 201-209.
62. Chen, C. C., J. J. Carson, J. Feser, B. Tamburini, S. Zabaronick, J. Linger and J. K. Tyler (2008). "Acetylated lysine 56 on histone H3 drives chromatin assembly after repair and signals for the completion of repair." *Cell* 134(2): 231-243.
63. Chen, S. H., C. P. Albuquerque, J. Liang, R. T. Suhandynata and H. Zhou (2010). "A proteome-wide analysis of kinase-substrate network in the DNA damage response." *J Biol Chem* 285(17): 12803-12812.
64. Chen, S. H., M. B. Smolka and H. Zhou (2007). "Mechanism of Dun1 activation by Rad53 phosphorylation in *Saccharomyces cerevisiae*." *J Biol Chem* 282(2): 986-995.
65. Cheung, V., G. Chua, N. N. Batada, C. R. Landry, S. W. Michnick, T. R. Hughes and F. Winston (2008). "Chromatin- and transcription-related factors repress transcription from within coding regions throughout the *Saccharomyces cerevisiae* genome." *PLoS Biol* 6(11): e277.
66. Cho, R. J., M. J. Campbell, E. A. Winzler, L. Steinmetz, A. Conway, L. Wodicka, T. G. Wolfsberg, A. E. Gabrielian, D. Landsman, D. J. Lockhart and R. W. Davis (1998). "A genome-wide transcriptional analysis of the mitotic cell cycle." *Mol Cell* 2(1): 65-73.
67. Choe, J., S. H. Ahn and Y. K. Kim (2014). "The mRNP remodeling mediated by UPF1 promotes rapid degradation of replication-dependent histone mRNA." *Nucleic Acids Res* 42(14): 9334-9349.
68. Chow, C. M., A. Georgiou, H. Szutorisz, A. Maia e Silva, A. Pombo, I. Barahona, E. Dargelos, C. Canzonetta and N. Dillon (2005). "Variant histone H3.3 marks promoters of transcriptionally active genes during mammalian cell division." *EMBO Rep* 6(4): 354-360.
69. Clark-Adams, C. D., D. Norris, M. A. Osley, J. S. Fassler and F. Winston (1988). "Changes in histone gene dosage alter transcription in yeast." *Genes Dev.* 2(2): 150-159.

70. Clemente-Ruiz, M., R. Gonzalez-Prieto and F. Prado (2011). "Histone H3K56 acetylation, CAF1, and Rtt106 coordinate nucleosome assembly and stability of advancing replication forks." *PLoS Genet* 7(11): e1002376.
71. Clerici, M., D. Mantiero, G. Lucchini and M. P. Longhese (2005). "The *Saccharomyces cerevisiae* Sae2 protein promotes resection and bridging of double strand break ends." *J Biol Chem* 280(46): 38631-38638.
72. Collier, J. M., M. Tucker, U. Sheth, M. A. Valencia-Sanchez and R. Parker (2001). "The DEAD box helicase, Dhh1p, functions in mRNA decapping and interacts with both the decapping and deadenylase complexes." *RNA* 7(12): 1717-1727.
73. Collins, G. A., T. A. Gomez, R. J. Deshaies and W. P. Tansey (2010). "Combined chemical and genetic approach to inhibit proteolysis by the proteasome." *Yeast* 27(11): 965-974.
74. Conde e Silva, N., B. E. Black, A. Sivolob, J. Filipinski, D. W. Cleveland and A. Prunell (2007). "CENP-A-containing nucleosomes: easier disassembly versus exclusive centromeric localization." *J Mol Biol* 370(3): 555-573.
75. Costelloe, T. and N. F. Lowndes (2010). "Chromatin assembly and signalling the end of DNA repair requires acetylation of histone H3 on lysine 56." *Subcell Biochem* 50: 43-54.
76. Cote, J., J. Quinn, J. L. Workman and C. L. Peterson (1994). "Stimulation of GAL4 derivative binding to nucleosomal DNA by the yeast SWI/SNF complex." *Science* 265(5168): 53-60.
77. Das, C., M. S. Lucia, K. C. Hansen and J. K. Tyler (2009). "CBP/p300-mediated acetylation of histone H3 on lysine 56." *Nature* 459(7243): 113-117.
78. Das, C., M. S. Lucia, K. C. Hansen and J. K. Tyler (2009). "CBP/p300-mediated acetylation of histone H3 on lysine 56." *Nature* 459(7243): 113-117.
79. Davey, C. A., D. F. Sargent, K. Luger, A. W. Maeder and T. J. Richmond (2002). "Solvent mediated interactions in the structure of the nucleosome core particle at 1.9 Å resolution." *J Mol Biol* 319(5): 1097-1113.
80. de Ruijter, A. J., A. H. van Gennip, H. N. Caron, S. Kemp and A. B. van Kuilenburg (2003). "Histone deacetylases (HDACs): characterization of the classical HDAC family." *Biochem J* 370(Pt 3): 737-749.
81. De Sanctis, V., C. Bertozzi, G. Costanzo, E. Di Mauro and R. Negri (2001). "Cell cycle arrest determines the intensity of the global transcriptional response of *Saccharomyces cerevisiae* to ionizing radiation." *Rad Res* 156: 379-387.

82. Delbarre, E., K. Ivanauskiene, T. Kuntziger and P. Collas (2013). "DAXX-dependent supply of soluble (H3.3-H4) dimers to PML bodies pending deposition into chromatin." *Genome Res* 23(3): 440-451.
83. Denis, C. L. and T. Malvar (1990). "The CCR4 gene from *Saccharomyces cerevisiae* is required for both nonfermentative and spt-mediated gene expression." *Genetics* 124(2): 283-291.
84. DeSilva, H., K. Lee and M. A. Osley (1998). "Functional dissection of yeast Hir1p, a WD repeat-containing transcriptional corepressor." *Genetics* 148(2): 657-667.
85. Dhalluin, C., J. E. Carlson, L. Zeng, C. He, A. K. Aggarwal and M. M. Zhou (1999). "Structure and ligand of a histone acetyltransferase bromodomain." *Nature* 399(6735): 491-496.
86. Dick, C. and E. W. Johns (1969). "A quantitative comparison of histones from immature and mature erythroid cells of the duck." *Biochim Biophys Acta* 175(2): 414-418.
87. Dimova, D., Z. Nackerdien, S. Furgeson, S. Eguchi and M. A. Osley (1999). "A role for transcriptional repressors in targeting the yeast Swi/Snf complex." *Mol Cell* 4(1): 75-83.
88. Dimri, G. P., X. Lee, G. Basile, M. Acosta, G. Scott, C. Roskelley, E. E. Medrano, M. Linskens, I. Rubelj, O. Pereira-Smith and et al. (1995). "A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin *in vivo*." *Proc Natl Acad Sci U S A* 92(20): 9363-9367.
89. Dion, M. F., T. Kaplan, M. Kim, S. Buratowski, N. Friedman and O. J. Rando (2007). "Dynamics of replication-independent histone turnover in budding yeast." *Science* 315(5817): 1405-1408.
90. Dokmanovic, M., C. Clarke and P. A. Marks (2007). "Histone deacetylase inhibitors: overview and perspectives." *Mol Cancer Res* 5(10): 981-989.
91. Dollard, C., S. L. Ricupero-Hovasse, G. Natsoulis, J. D. Boeke and F. Winston (1994). "SPT10 and SPT21 are required for transcription of particular histone genes in *Saccharomyces cerevisiae*." *Mol Cell Biol* 14(8): 5223-5228.
92. Dominski, Z. and W. F. Marzluff (1999). "Formation of the 3' end of histone mRNA." *Gene* 239(1): 1-14.
93. Dominski, Z., X. Yang, H. Kaygun, M. Dadlez and W. F. Marzluff (2003). "A 3' exonuclease that specifically interacts with the 3' end of histone mRNA." *Mol. Cell* 12: 295-305.

94. Dovey, O. M., C. T. Foster and S. M. Cowley (2010). "Histone deacetylase 1 (HDAC1), but not HDAC2, controls embryonic stem cell differentiation." *Proc Natl Acad Sci U S A* 107(18): 8242-8247.
95. Drane, P., K. Ouararhni, A. Depaux, M. Shuaib and A. Hamiche (2010). "The death-associated protein DAXX is a novel histone chaperone involved in the replication-independent deposition of H3.3." *Genes Dev* 24(12): 1253-1265.
96. Driscoll, R., A. Hudson and S. P. Jackson (2007). "Yeast Rtt109 promotes genome stability by acetylating histone H3 on lysine 56." *Science* 315(5812): 649-652.
97. Driscoll, R., A. Hudson and S. P. Jackson (2007). "Yeast Rtt109 promotes genome stability by acetylating histone H3 on lysine 56." *Science* 315(5812): 649-652.
98. Drogaris, P., V. Villeneuve, C. Pomies, E. H. Lee, V. Bourdeau, E. Bonneil, G. Ferbeyre, A. Verreault and P. Thibault (2012). "Histone deacetylase inhibitors globally enhance h3/h4 tail acetylation without affecting h3 lysine 56 acetylation." *Sci Rep* 2: 220.
99. Drogaris, P., H. Wurtele, H. Masumoto, A. Verreault and P. Thibault (2008). "Comprehensive profiling of histone modifications using a label-free approach and its applications in determining structure-function relationships." *Anal Chem* 80(17): 6698-6707.
100. Du, J., I. Nasir, B. K. Benton, M. P. Kladde and B. C. Laurent (1998). "Sth1p, a *Saccharomyces cerevisiae* Snf2p/Swi2p homolog, is an essential ATPase in RSC and differs from Snf/Swi in its interactions with histones and chromatin-associated proteins." *Genetics* 150(3): 987-1005.
101. Dubrana, K., H. van Attikum, F. Hediger and S. M. Gasser (2007). "The processing of double-strand breaks and binding of single-strand-binding proteins RPA and Rad51 modulate the formation of ATR-kinase foci in yeast." *J Cell Sci* 120(Pt 23): 4209-4220.
102. Durbin, K. R., J. C. Tran, L. Zamdborg, S. M. Sweet, A. D. Catherman, J. E. Lee, M. Li, J. F. Kellie and N. L. Kelleher (2010). "Intact mass detection, interpretation, and visualization to automate Top-Down proteomics on a large scale." *Proteomics* 10(20): 3589-3597.
103. Dyer, P. N., R. S. Edayathumangalam, C. L. White, Y. Bao, S. Chakravarthy, U. M. Muthurajan and K. Luger (2004). "Reconstitution of nucleosome core particles from recombinant histones and DNA." *Methods Enzymol* 375: 23-44.
104. Edman, P. (1949). "A method for the determination of amino acid sequence in peptides." *Arch Biochem* 22(3): 475.

105. Egelhofer, T. A., A. Minoda, S. Klugman, K. Lee, P. Kolasinska-Zwierz, A. A. Alekseyenko, M. S. Cheung, D. S. Day, S. Gadel, A. A. Gorchakov, T. Gu, P. V. Kharchenko, S. Kuan, I. Latorre, D. Linder-Basso, Y. Luu, Q. Ngo, M. Perry, A. Rechtsteiner, N. C. Riddle, Y. B. Schwartz, G. A. Shanower, A. Vielle, J. Ahringer, S. C. Elgin, M. I. Kuroda, V. Pirrotta, B. Ren, S. Strome, P. J. Park, G. H. Karpen, R. D. Hawkins and J. D. Lieb (2011). "An assessment of histone-modification antibody quality." *Nat Struct Mol Biol* 18(1): 91-93.
106. Emili, A. (1998). "MEC1-dependent phosphorylation of Rad9p in response to DNA damage." *Mol Cell* 2(2): 183-189.
107. Emili, A., D. M. Schieltz, J. R. Yates 3rd and L. H. Hartwell (2001). "Dynamic interaction of DNA damage checkpoint protein Rad53 with chromatin assembly factor Asf1." *Mol Cell* 7(1): 13-20.
108. Enomoto, S. and J. Berman (1998). "Chromatin assembly factor I contributes to the maintenance, but not the re-establishment, of silencing at the yeast silent mating loci." *Genes Dev* 12(2): 219-232.
109. Eriksson, P. R., D. Ganguli and D. J. Clark (2011). "Spt10 and Swi4 control the timing of histone H2A/H2B gene activation in budding yeast." *Mol Cell Biol* 31(3): 557-572.
110. Eriksson, P. R., D. Ganguli, V. Nagarajavel and D. J. Clark (2012). "Regulation of histone gene expression in budding yeast." *Genetics* 191(1): 7-20.
111. Eriksson, P. R., G. Mendiratta, N. B. McLaughlin, T. G. Wolfsberg, L. Marino-Ramirez, T. A. Pompa, M. Jainerin, D. Landsman, C.-H. Shen and D. J. Clark (2005). "Global regulation by the yeast Spt10 protein is mediated through chromatin structure and the histone upstream activating sequence elements." *Mol Cell Biol* 25(20): 9127-9137.
112. Fahrner, K., J. Yarger and L. Hereford (1980). "Yeast histone mRNA is polyadenylated." *Nucleic Acids Res* 8(23): 5725-5737.
113. Fallick, A. M., W. S. Lane, K. S. Lilley, M. J. MacCoss, B. S. Phinney, N. E. Sherman, S. T. Weintraub, H. E. Witkowska and N. A. Yates (2011). "ABRF-PRG07: advanced quantitative proteomics study." *J Biomol Tech* 22(1): 21-26.
114. Fassler, J. S. and F. Winston (1988). "Isolation and analysis of a novel class of suppressor of Ty insertion mutations in *Saccharomyces cerevisiae*." *Genetics* 118(2): 203-212.
115. Fazly, A., Q. Li, Q. Hu, G. Mer, B. Horazdovsky and Z. Zhang (2012). "Histone chaperone Rtt106 promotes nucleosome formation using (H3-H4)₂ tetramers." *J Biol Chem* 287(14): 10753-10760.

116. FDA (2014). "Beleodaq approved for rare lymphomas." *Cancer Discov* 4(9): 978.
117. FDA (2015). "Panobinostat Approved for Multiple Myeloma." *Cancer Discov*.
118. Ferreira, M. E., K. Flaherty and P. Prochasson (2011). "The *Saccharomyces cerevisiae* histone chaperone Rtt106 mediates the cell cycle recruitment of SWI/SNF and RSC to the HIR-dependent histone genes." *PLoS One* 6(6): e21113.
119. Field, Y., N. Kaplan, Y. Fondufe-Mittendorf, I. K. Moore, E. Sharon, Y. Lubling, J. Widom and E. Segal (2008). "Distinct modes of regulation by chromatin encoded through nucleosome positioning signals." *PLoS Comput Biol* 4(11): e1000216.
120. Fillingham, J., P. Kainth, J.-P. Lambert, H. van Bakel, K. Tsui, L. Pena-Castillo, C. Nislow, D. Figeys, T. R. Hughes, J. Greenblatt and B. J. Andrews (2009). "Two-color cell array screen reveals interdependent roles for histone chaperones and a chromatin boundary regulator in histone gene repression." *Mol Cell* 35(3): 340-351.
121. Fillingham, J., P. Kainth, J. P. Lambert, H. van Bakel, K. Tsui, L. Pena-Castillo, C. Nislow, D. Figeys, T. R. Hughes, J. Greenblatt and B. J. Andrews (2009). "Two-color cell array screen reveals interdependent roles for histone chaperones and a chromatin boundary regulator in histone gene repression." *Mol Cell* 35(3): 340-351.
122. Fillingham, J., J. Recht, A. C. Silva, B. Suter, A. Emili, I. Stagljar, N. J. Krogan, C. D. Allis, M. C. Keogh and J. F. Greenblatt (2008). "Chaperone control of the activity and specificity of the histone H3 acetyltransferase Rtt109." *Mol Cell Biol* 28(13): 4342-4353.
123. Finnin, M. S., J. R. Donigian, A. Cohen, V. M. Richon, R. A. Rifkind, P. A. Marks, R. Breslow and N. P. Pavletich (1999). "Structures of a histone deacetylase homologue bound to the TSA and SAHA inhibitors." *Nature* 401(6749): 188-193.
124. Flemming, W. (1882). "Zell-substanz, Kern und Zelltheilung." F.C.W. Vogel, Leipzig.
125. Formosa, T. (2003). "Changing the DNA landscape: putting a SPN on chromatin." *Curr Top Microbiol Immunol* 274: 171-201.
126. Formosa, T., S. Ruone, M. D. Adams, A. E. Olsen, P. Eriksson, Y. Yu, A. R. Rhoades, P. D. Kaufman and D. J. Stillman (2002). "Defects in SPT16 or POB3 (γ FACT) in *Saccharomyces cerevisiae* cause dependence on the Hir/Hpc pathway: polymerase passage may degrade chromatin structure." *Genetics* 162(4): 1557-1571.
127. Fraga, M. F., E. Ballestar, A. Villar-Garea, M. Boix-Chornet, J. Espada, G. Schotta, T. Bonaldi, C. Haydon, S. Ropero, K. Petrie, N. G. Iyer, A. Perez-Rosado, E. Calvo, J. A. Lopez, A. Cano, M. J. Calasanz, D. Colomer, M. A. Piris, N. Ahn, A. Imhof, C. Caldas, T. Jenuwein and M. Esteller (2005). "Loss of acetylation at Lys16 and trimethylation at

- Lys20 of histone H4 is a common hallmark of human cancer." *Nat Genet* 37(4): 391-400.
128. Franco, A. A., W. M. Lam, P. M. Burgers and P. D. Kaufman (2005). "Histone deposition protein Asf1 maintains DNA replisome integrity and interacts with replication factor C." *Genes Dev* 19(11): 1365-1375.
 129. Freeman, K. B., L. R. Karns, K. A. Lutz and M. M. Smith (1992). "Histone H3 transcription in *Saccharomyces cerevisiae* is controlled by multiple cell cycle activation sites and a constitutive negative regulatory element." *Mol Cell Biol* 12(12): 5455-5463.
 130. Furdas, S. D., S. Kannan, W. Sippl and M. Jung (2012). "Small molecule inhibitors of histone acetyltransferases as epigenetic tools and drug candidates." *Arch Pharm (Weinheim)* 345(1): 7-21.
 131. Furumai, R., Y. Komatsu, N. Nishino, S. Khochbin, M. Yoshida and S. Horinouchi (2001). "Potent histone deacetylase inhibitors built from trichostatin A and cyclic tetrapeptide antibiotics including trapoxin." *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(1): 87-92.
 132. Garcia, B. A., S. A. Busby, C. M. Barber, J. Shabanowitz, C. D. Allis and D. F. Hunt (2004). "Characterization of phosphorylation sites on histone H1 isoforms by tandem mass spectrometry." *J Proteome Res* 3(6): 1219-1227.
 133. Garcia, B. A., S. B. Hake, R. L. Diaz, M. Kauer, S. A. Morris, J. Recht, J. Shabanowitz, N. Mishra, B. D. Strahl, C. D. Allis and D. F. Hunt (2007). "Organismal differences in post-translational modifications in histones H3 and H4." *J Biol Chem* 282(10): 7641-7655.
 134. Garcia, B. A., S. Mollah, B. M. Ueberheide, S. A. Busby, T. L. Muratore, J. Shabanowitz and D. F. Hunt (2007). "Chemical derivatization of histones for facilitated analysis by mass spectrometry." *Nat Protoc* 2(4): 933-938.
 135. Gasch, A. P., M. Huang, S. Metzner, D. Botstein, S. J. Elledge and P. O. Brown (2001). "Genomic expression responses to DNA damaging agents and the regulatory role of the yeast ATR homolog Mec1p." *Mol Biol Cell* 12: 2987-3003.
 136. Gasser, R., T. Koller and J. M. Sogo (1996). "The stability of nucleosomes at the replication fork." *J Mol Biol* 258(2): 224-239.
 137. Gavin, A.-C., M. Bosche, R. Krause, P. Grandi, M. Marzioch, A. Bauer, J. Schultz, J. M. Rick, A. M. Michon, C. M. Cruciat, M. Remor, C. Hofert, M. Schelder, M. Brajenovic, H. Ruffner, A. Merino, K. Klein, M. Hudak, D. Dickson, T. Rudi, V. Gnau, A. Bauch, S. Bastuck, B. Huhse, C. Leutwein, M. A. Heurtier, R. R. Copley, A. Edlmann, E. Querfurth, V. Rybin, G. Drewes, M. Raida, T. Bouwmeester, P. Bork, B. Seraphin, B. Kuster, G. Neubauer and G.

- Superti-Furga (2002). "Functional organization of the yeast proteome by systematic analysis of protein complexes." *Nature* 415: 141-147.
138. Geng, F., Y. Cao and B. C. Laurent (2001). "Essential roles of Snf5p in Snf-Swi chromatin remodeling *in vivo*." *Mol Cell Biol* 21(13): 4311-4320.
139. Giaever, G., A. M. Chu, L. Ni, C. Connelly, L. Riles, S. Veronneau, S. Dow, A. Luca-Danila, K. Anderson, B. Andre, A. P. Arkin, A. Astromoff, M. El-Bakkoury, R. Bangham, R. Benito, S. Brachat, S. Campanaro, M. Curtiss, K. Davis, A. Deutschbauer, K. D. Entian, P. Flaherty, F. Foury, D. J. Garfinkel, M. Gerstein, D. Gotte, U. Guldener, J. H. Hegemann, S. Hempel, Z. Herman, D. F. Jaramillo, D. E. Kelly, S. L. Kelly, P. Kotter, D. LaBonte, D. C. Lamb, N. Lan, H. Liang, H. Liao, L. Liu, C. Luo, M. Lussier, R. Mao, P. Menard, S. L. Ooi, J. L. Revuelta, C. J. Roberts, M. Rose, P. Ross-Macdonald, B. Scherens, G. Schimmack, B. Shafer, D. D. Shoemaker, S. Sookhai-Mahadeo, R. K. Storms, J. N. Strathern, G. Valle, M. Voet, G. Volckaert, C. Y. Wang, T. R. Ward, J. Wilhelmy, E. A. Winzeler, Y. Yang, G. Yen, E. Youngman, K. Yu, H. Bussey, J. D. Boeke, M. Snyder, P. Philippsen, R. W. Davis and M. Johnston (2002). "Functional profiling of the *Saccharomyces cerevisiae* genome." *Nature* 418(6896): 387-391.
140. Gilbert, C. S., C. M. Green and N. F. Lowndes (2001). "Budding yeast Rad9 is an ATP-dependent Rad53 activating machine." *Mol Cell* 8: 129-136.
141. Gold, P. and S. O. Freedman (1965). "Specific carcinoembryonic antigens of the human digestive system." *J Exp Med* 122(3): 467-481.
142. Goldberg, A. D., L. A. Banaszynski, K. M. Noh, P. W. Lewis, S. J. Elsaesser, S. Stadler, S. Dewell, M. Law, X. Guo, X. Li, D. Wen, A. Chapgier, R. C. DeKolver, J. C. Miller, Y. L. Lee, E. A. Boydston, M. C. Holmes, P. D. Gregory, J. M. Greally, S. Rafii, C. Yang, P. J. Scambler, D. Garrick, R. J. Gibbons, D. R. Higgs, I. M. Cristea, F. D. Urnov, D. Zheng and C. D. Allis (2010). "Distinct factors control histone variant H3.3 localization at specific genomic regions." *Cell* 140(5): 678-691.
143. Gottschling, D. E., O. M. Aparicio, B. L. Billington and V. A. Zakian (1990). "Position effect at *S. cerevisiae* telomeres: reversible repression of Pol II transcription." *Cell* 63(4): 751-762.
144. Gradolatto, A., R. S. Rogers, H. Lavender, S. D. Taverna, C. D. Allis, J. D. Aitchison and A. J. Tackett (2008). "*Saccharomyces cerevisiae* Yta7 regulates histone gene expression." *Genetics* 179(1): 291-304.
145. Green, E. M., A. J. Antczak, A. O. Bailey, A. A. Franco, K. J. Wu, J. R. Yates, 3rd and P. D. Kaufman (2005). "Replication-independent histone deposition by the HIR complex and Asf1." *Curr Biol* 15(22): 2044-2049.

146. Green, E. M., A. J. Antczak, A. O. Bailey, A. A. Franco, K. J. Wu, J. R. Yates and P. D. Kaufman (2005). "Replication-independent histone deposition by the HIR complex and Asf1." *Curr Biol* 15(22): 2044-2049.
147. Griffiths A.F., Miller J.H., Suzuki d.T., Lewontin R.C. and G. W.M. (2000). "An Introduction to Genetic Analysis, 7th edition."
148. Groth, A., D. Ray-Gallet, J. P. Quivy, J. Lukas, J. Bartek and G. Almouzni (2005). "Human Asf1 regulates the flow of S phase histones during replicational stress." *Mol Cell* 17(2): 301-311.
149. Groth, A., W. Rocha, A. Verreault and G. Almouzni (2007). "Chromatin challenges during DNA replication and repair." *Cell* 128(4): 721-733.
150. Grove, G. W. and A. Zweidler (1984). "Regulation of nucleosomal core histone variant levels in differentiating murine erythroleukemia cells." *Biochemistry* 23(19): 4436-4443.
151. Gu, B., K. Watanabe and X. Dai (2012). "Pygo2 regulates histone gene expression and H3 K56 acetylation in human mammary epithelial cells." *Cell Cycle* 11(1): 79-87.
152. Guacci, V., E. Hogan and D. Koshland (1997). "Centromere position in budding yeast: evidence for anaphase A." *Mol Biol Cell* 8(6): 957-972.
153. Gunjan, A., J. Paik and A. Verreault (2006). "The emergence of regulated histone proteolysis." *Curr Opin Genet Dev* 16(2): 112-118.
154. Gunjan, A. and A. Verreault (2003). "A Rad53 kinase-dependent surveillance mechanism that regulates histone protein levels in *S. cerevisiae*." *Cell* 115: 537-549.
155. Gunjan, A. and A. Verreault (2003). "A Rad53 kinase-dependent surveillance mechanism that regulates histone protein levels in *S. cerevisiae*." *Cell* 115(5): 537-549.
156. Halford, S., R. Wadey, C. Roberts, S. C. Daw, J. A. Whiting, H. O'Donnell, I. Dunham, D. Bentley, E. Lindsay, A. Baldini and et al. (1993). "Isolation of a putative transcriptional regulator from the region of 22q11 deleted in DiGeorge syndrome, Shprintzen syndrome and familial congenital heart disease." *Hum Mol Genet* 2(12): 2099-2107.
157. Halkidou, K., L. Gaughan, S. Cook, H. Y. Leung, D. E. Neal and C. N. Robson (2004). "Upregulation and nuclear recruitment of HDAC1 in hormone refractory prostate cancer." *Prostate* 59(2): 177-189.
158. Hall, C., D. M. Nelson, X. Ye, K. Baker, J. A. DeCaprio, S. Seeholzer, M. Lipinski and P. D. Adams (2001). "HIRA, the human homologue of yeast Hir1p and Hir2p, is a novel

- cyclin-cdk2 substrate whose expression blocks S-phase progression." *Mol Cell Biol* 21(5): 1854-1865.
159. Han, J., H. Zhou, Z. Li, R. M. Xu and Z. Zhang (2007a). "The Rtt109-Vps75 histone acetyltransferase complex acetylates non-nucleosomal histone H3." *J Biol Chem* 282(19): 14158-14164.
160. Han, J., H. Zhou, Z. Li, R. M. Xu and Z. Zhang (2007b). "Acetylation of lysine 56 of histone H3 catalyzed by RTT109 and regulated by ASF1 is required for replisome integrity." *J Biol Chem* 282(39): 28587-28596.
161. Harris, M. E., R. Bohni, M. H. Schneiderman, L. Ramamurthy, D. Schumperli and W. F. Marzluff (1991). "Regulation of histone mRNA in the unperturbed cell cycle: evidence suggesting control at two posttranscriptional steps." *Mol Cell Biol* 11(5): 2416-2424.
162. Henikoff, S. and Y. Dalal (2005). "Centromeric chromatin: what makes it unique?" *Curr Opin Genet Dev* 15(2): 177-184.
163. Herbig, U. and J. M. Sedivy (2006). "Regulation of growth arrest in senescence: telomere damage is not the end of the story." *Mech Ageing Dev* 127(1): 16-24.
164. Hereford, L., S. Bromley and M. A. Osley (1982). "Periodic transcription of yeast histone genes." *Cell* 30(1): 305-310.
165. Hereford, L., S. Bromley and M. A. Osley (1982). "Periodic transcription of yeast histone genes." *Cell* 30: 305-310.
166. Hereford, L., K. Fahrner, J. Woolford, Jr., M. Rosbash and D. B. Kaback (1979). "Isolation of yeast histone genes H2A and H2B." *Cell* 18(4): 1261-1271.
167. Hereford, L. M., M. A. Osley, T. R. Ludwig and C. S. McLaughlin (1981). "Cell-cycle regulation of yeast histone mRNA." *Cell* 24(2): 367-375.
168. Herrero, A. B. and S. Moreno (2011). "Lsm1 promotes genomic stability by controlling histone mRNA decay." *Embo J* 30(10): 2008-2018.
169. Herrick, D., R. Parker and A. Jacobson (1990). "Identification and comparison of stable and unstable mRNAs in *Saccharomyces cerevisiae*." *Mol. Cell. Biol.* 10: 2269-2284.
170. Hess, D., B. Liu, N. R. Roan, R. Sternglanz and F. Winston (2004). "Spt10-dependent transcriptional activation in *Saccharomyces cerevisiae* requires both the Spt10 acetyltransferase domain and Spt21." *Mol Cell Biol* 24(1): 135-143.

171. Hess, D. and F. Winston (2005). "Evidence that Spt10 and Spt21 of *Saccharomyces cerevisiae* play distinct roles *in vivo* and functionally interact with MCB-binding factor, SCB-binding factor and Snf1." *Genetics* 170(1): 87-94.
172. Hoch, N. C., E. S. Chen, R. Buckland, S. C. Wang, A. Fazio, A. Hammet, A. Pelliccioli, A. Chabes, M. D. Tsai and J. Heierhorst (2013). "Molecular basis of the essential s phase function of the rad53 checkpoint kinase." *Mol Cell Biol* 33(16): 3202-3213.
173. Hu, F., A. A. Alcasabas and S. J. Elledge (2001). "Asf1 links Rad53 to control of chromatin assembly." *Genes Dev* 15(9): 1061-1066.
174. Hu, J., L. Sun, F. Shen, Y. Chen, Y. Hua, Y. Liu, M. Zhang, Y. Hu, Q. Wang, W. Xu, F. Sun, J. Ji, J. M. Murray, A. M. Carr and D. Kong (2012). "The intra-S phase checkpoint targets Dna2 to prevent stalled replication forks from reversing." *Cell* 149(6): 1221-1232.
175. Huang, M., Z. Zhou and S. J. Elledge (1998). "The DNA replication and damage checkpoint pathways induce transcription by inhibition of the Crt1 repressor." *Cell* 94: 595-605.
176. Huang, S., H. Zhou, D. Katzmann, M. Hochstrasser, E. Atanasova and Z. Zhang (2005). "Rtt106p is a histone chaperone involved in heterochromatin-mediated silencing." *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(38): 13410-13415.
177. Huang, Y., S. N. Vasilatos, L. Boric, P. G. Shaw and N. E. Davidson (2012). "Inhibitors of histone demethylation and histone deacetylation cooperate in regulating gene expression and inhibiting growth in human breast cancer cells." *Breast Cancer Res Treat* 131(3): 777-789.
178. Hughes, A. (1959). "A History of Cytology 100–101." Abelard–Schuman.
179. Hyman, A. A. and P. K. Sorger (1995). "Structure and function of kinetochores in budding yeast." *Annu Rev Cell Dev Biol* 11: 471-495.
180. Ishimi, Y. and A. Kikuchi (1991). "Identification and molecular cloning of yeast homolog of nucleosome assembly protein I which facilitates nucleosome assembly *in vitro*." *J Biol Chem* 266(11): 7025-7029.
181. Ito, T., M. E. Levenstein, D. V. Fyodorov, A. K. Kutach, R. Kobayashi and J. T. Kadonaga (1999). "ACF consists of two subunits, Acf1 and ISWI, that function cooperatively in the ATP-dependent catalysis of chromatin assembly." *Genes Dev* 13(12): 1529-1539.
182. Iyer, V. R., C. E. Horak, C. S. Scafe, D. Botstein, M. Snyder and P. O. Brown (2001). "Genomic binding sites of the yeast cell-cycle transcription factors SBF and MBF." *Nature* 409(6819): 533-538.

183. Jacob, F. and S. Brenner (1963). "[On the regulation of DNA synthesis in bacteria: the hypothesis of the replicon]." *C R Hebd Seances Acad Sci* 256: 298-300.
184. Jeanmougin, F., J. M. Wurtz, B. Le Douarin, P. Chambon and R. Losson (1997). "The bromodomain revisited." *Trends Biochem Sci* 22(5): 151-153.
185. Jelinsky, S. A., P. Estep, G. M. Church and L. D. Samson (2000). "Regulatory networks revealed by transcriptional profiling of damaged *Saccharomyces cerevisiae* cells: Rpn4 links base excision repair with proteasomes." *Mol Cell Biol* 20: 8157-8167.
186. Jena, N. R. (2012). "DNA damage by reactive species: Mechanisms, mutation and repair." *J Biosci* 37(3): 503-517.
187. Jenuwein, T. and C. D. Allis (2001). "Translating the histone code." *Science* 293(5532): 1074-1080.
188. Jin, C. and G. Felsenfeld (2007). "Nucleosome stability mediated by histone variants H3.3 and H2A.Z." *Genes Dev* 21(12): 1519-1529.
189. John, S., L. Howe, S. T. Tafrov, P. A. Grant, R. Sternglanz and J. L. Workman (2000). "The something about silencing protein, Sas3, is the catalytic subunit of NuA3, a γ TAF(II)30-containing HAT complex that interacts with the Spt16 subunit of the yeast CP (Cdc68/Pob3)-FACT complex." *Genes Dev* 14(10): 1196-1208.
190. Johnstone, R. W. (2002). "Histone-deacetylase inhibitors: novel drugs for the treatment of cancer." *Nat Rev Drug Discov* 1(4): 287-299.
191. Kaneko, Y., A. Toh-e and Y. Oshima (1982). "Identification of the genetic locus for the structural gene and a new regulatory gene for the synthesis of repressible alkaline phosphatase in *Saccharomyces cerevisiae*." *Mol Cell Biol* 2(2): 127-137.
192. Kaplan, T., C. L. Liu, J. A. Erkmann, J. Holik, M. Grunstein, P. D. Kaufman, N. Friedman and O. J. Rando (2008). "Cell cycle- and chaperone-mediated regulation of H3K56ac incorporation in yeast." *PLoS Genet* 4(11): e1000270.
193. Kasten, M., H. Szerlong, H. Erdjument-Bromage, P. Tempst, M. Werner and B. R. Cairns (2004). "Tandem bromodomains in the chromatin remodeler RSC recognize acetylated histone H3 Lys14." *EMBO J* 23(6): 1348-1359.
194. Kaufman, P. D., J. L. Cohen and M. A. Osley (1998). "Hir proteins are required for position-dependent gene silencing in *Saccharomyces cerevisiae* in the absence of chromatin assembly factor I." *Mol Cell Biol* 18(8): 4793-4806.

195. Kaygun, H. and W. F. Marzluff (2005). "Regulated degradation of replication-dependent histone mRNAs requires both ATR and Upf1." *Nat Struct Mol Biol* 12(9): 794-800.
196. Khorasanizadeh, S. (2004). "The nucleosome: from genomic organization to genomic regulation." *Cell* 116(2): 259-272.
197. Kim, U.-J., M. Han, P. Kayne and M. Grunstein (1988). "Effects of histone H4 depletion on the cell cycle and transcription of *Saccharomyces cerevisiae*." *EMBO J* 7(7): 2211-2219.
198. Kirov, N., A. Shtilbans and C. Rushlow (1998). "Isolation and characterization of a new gene encoding a member of the HIRA family of proteins from *Drosophila melanogaster*." *Gene* 212(2): 323-332.
199. Klug, A. (1974). "Rosalind Franklin and the double helix." *Nature* 248(5451): 787-788.
200. Kobrynski, L. J. and K. E. Sullivan (2007). "Velocardiofacial syndrome, DiGeorge syndrome: the chromosome 22q11.2 deletion syndromes." *Lancet* 370(9596): 1443-1452.
201. Koch, C. and K. Nasmyth (1994). "Cell cycle regulated transcription in yeast." *Curr Opin Cell Biol* 6(3): 451-459.
202. Kolonko, E. M., B. N. Albaugh, S. E. Lindner, Y. Chen, K. A. Satyshur, K. M. Arnold, P. D. Kaufman, J. L. Keck and J. M. Denu (2010). "Catalytic activation of histone acetyltransferase Rtt109 by a histone chaperone." *Proc Natl Acad Sci U S A* 107(47): 20275-20280.
203. Kong, S., S. J. Kim, B. Sandal, S. M. Lee, B. Gao, D. D. Zhang and D. Fang (2011). "The type III histone deacetylase Sirt1 protein suppresses p300-mediated histone H3 lysine 56 acetylation at Bclaf1 promoter to inhibit T cell activation." *J Biol Chem* 286(19): 16967-16975.
204. Korber, P. and S. Barbaric (2015). "The yeast PHO5 promoter: from single locus to systems biology of a paradigm for gene regulation through chromatin." *Nucleic Acids Res* 42(17): 10888-10902.
205. Kornberg, R. D. (1974). "Chromatin structure: a repeating unit of histones and DNA." *Science* 184(4139): 868-871.
206. Kouzarides, T. (2007). "Chromatin modifications and their function." *Cell* 128(4): 693-705.

207. Krawitz, D. C., T. Kama and P. D. Kaufman (2002). "Chromatin assembly factor I mutants defective for PCNA binding require Asf1/Hir proteins for silencing." *Mol Cell Biol* 22(2): 614-625.
208. Krude, T. (1999). "Chromatin assembly during DNA replication in somatic cells." *Eur J Biochem* 263(1): 1-5.
209. Kumar Singh, R., M.-H. Miquel Kabbaj, J. Paik, A. Verreault and A. Gunjan (2007). "Histone levels are regulated by phosphorylation and ubiquitylation dependent proteolysis in *S. cerevisiae*." *Cell*.
210. Kurat, C. F., J. P. Lambert, D. van Dyk, K. Tsui, H. van Bakel, S. Kaluarachchi, H. Friesen, P. Kainth, C. Nislow, D. Figeys, J. Fillingham and B. J. Andrews (2011). "Restriction of histone gene transcription to S phase by phosphorylation of a chromatin boundary protein." *Genes Dev* 25(23): 2489-2501.
211. Kushnirov, V. V. (2000). "Rapid and reliable protein extraction from yeast." *Yeast* 16(9): 857-860.
212. Lamour, V., Y. Lecluse, C. Desmaze, M. Spector, M. Bodescot, A. Aurias, M. A. Osley and M. Lipinski (1995). "A human homolog of the *S. cerevisiae* HIR1 and HIR2 transcriptional repressors cloned from the DiGeorge syndrome critical region." *Hum Mol Genet* 4(5): 791-799.
213. Larimer, F. W., C. L. Hsu, M. K. Maupin and A. Stevens (1992). "Characterization of the XRN1 gene encoding a 5'→3' exoribonuclease: sequence data and analysis of disparate protein and mRNA levels of gene-disrupted yeast cells." *Gene* 120(1): 51-57.
214. Larson, E. M., D. J. Doughman, D. S. Gregerson and W. F. Obritsch (1997). "A new, simple, nonradioactive, nontoxic *in vitro* assay to monitor corneal endothelial cell viability." *Invest Ophthalmol Vis Sci* 38(10): 1929-1933.
215. Laurent, B. C., I. Treich and M. Carlson (1993). "The yeast SNF2/SWI2 protein has DNA-stimulated ATPase activity required for transcriptional activation." *Genes Dev* 7(4): 583-591.
216. Lawrimore, J., K. S. Bloom and E. D. Salmon (2011). "Point centromeres contain more than a single centromere-specific Cse4 (CENP-A) nucleosome." *J Cell Biol* 195(4): 573-582.
217. Lee, C. K., Y. Shibata, B. Rao, B. D. Strahl and J. D. Lieb (2004). "Evidence for nucleosome depletion at active regulatory regions genome-wide." *Nat Genet* 36(8): 900-905.

218. Lee, M. J., Y. S. Kim, S. Kummar, G. Giaccone and J. B. Trepel (2008). "Histone deacetylase inhibitors in cancer therapy." *Curr Opin Oncol* 20(6): 639-649.
219. Lee, Y. D., J. Wang, J. Stubbe and S. J. Elledge (2008). "Dif1 is a DNA-damage-regulated facilitator of nuclear import for ribonucleotide reductase." *Mol Cell* 32(1): 70-80.
220. Lejeune, E., M. Bortfeld, S. A. White, A. L. Pidoux, K. Ekwall, R. C. Allshire and A. G. Ladurner (2007). "The chromatin-remodeling factor FACT contributes to centromeric heterochromatin independently of RNAi." *Curr Biol* 17(14): 1219-1224.
221. Leroy, C., S. E. Lee, M. B. Vaze, F. Ochsenbien, R. Guerois, J. E. Haber and M. C. Marsolier-Kergoat (2003). "PP2C phosphatases Ptc2 and Ptc3 are required for DNA checkpoint inactivation after a double-strand break." *Mol Cell* 11(3): 827-835.
222. Lewis, P. W., S. J. Elsaesser, K. M. Noh, S. C. Stadler and C. D. Allis (2010). "Daxx is an H3.3-specific histone chaperone and cooperates with ATRX in replication-independent chromatin assembly at telomeres." *Proc Natl Acad Sci U S A* 107(32): 14075-14080.
223. Li, Q., H. Zhou, H. Wurtele, B. Davies, B. Horazdovsky, A. Verreault and Z. Zhang (2008). "Acetylation of histone H3 lysine 56 regulates replication-coupled nucleosome assembly." *Cell* 134(2): 244-255.
224. Li, Q., H. Zhou, H. Wurtele, B. Davies, B. Horazdovsky, A. Verreault and Z. Zhang (2008). "Acetylation of histone H3 lysine 56 regulates replication-coupled nucleosome assembly." *Cell* 134(2): 244-255.
225. Li, Y., A. N. Jaramillo-Lambert, Y. Yang, R. Williams, N. H. Lee and W. Zhu (2011). "And-1 is required for the stability of histone acetyltransferase Gcn5." *Oncogene*.
226. Liang, D., S. L. Burkhart, R. K. Singh, M. H. Kabbaj and A. Gunjan (2012). "Histone dosage regulates DNA damage sensitivity in a checkpoint-independent manner by the homologous recombination pathway." *Nucleic Acids Res* 40(19): 9604-9620.
227. Libuda, D. E. and F. Winston (2006). "Amplification of histone genes by circular chromosome formation in *Saccharomyces cerevisiae*." *Nature* 443(7114): 1003-1007.
228. Lin, R. J., T. Sternsdorf, M. Tini and R. M. Evans (2001). "Transcriptional regulation in acute promyelocytic leukemia." *Oncogene* 20(49): 7204-7215.
229. Lisby, M. and R. Rothstein (2009). "Choreography of recombination proteins during the DNA damage response." *DNA Repair (Amst)* 8(9): 1068-1076.

230. Liu, H., R. G. Sadygov and J. R. Yates, 3rd (2004). "A model for random sampling and estimation of relative protein abundance in shotgun proteomics." *Anal Chem* 76(14): 4193-4201.
231. Liu, X., L. Wang, K. Zhao, P. R. Thompson, Y. Hwang, R. Marmorstein and P. A. Cole (2008). "The structural basis of protein acetylation by the p300/CBP transcriptional coactivator." *Nature* 451(7180): 846-850.
232. Lo, K. A., M. K. Bauchmann, A. P. Baumann, C. J. Donahue, M. A. Thiede, L. S. Hayes, S. A. des Etages and E. Fraenkel (2011). "Genome-wide profiling of H3K56 acetylation and transcription factor binding sites in human adipocytes." *PLoS One* 6(6): e19778.
233. Longhese, M. P., M. Clerici and G. Lucchini (2003). "The S-phase checkpoint and its regulation in *Saccharomyces cerevisiae*." *Mut. Res.* 532: 41-58.
234. Longtine, M. S., A. McKenzie 3rd, D. J. Demarini, N. G. Shah, A. Wach, A. Brachat, P. Philippsen and J. R. Pringle (1998). "Additional modules for versatile and economical PCR-based gene deletion and modification in *Saccharomyces cerevisiae*." *Yeast* 14: 953-961.
235. Lopes da Rosa, J., J. Holik, E. M. Green, O. J. Rando and P. D. Kaufman (2011). "Overlapping regulation of CenH3 localization and histone H3 turnover by CAF-1 and HIR proteins in *Saccharomyces cerevisiae*." *Genetics* 187(1): 9-19.
236. Lopes, M., C. Cotta-Ramusino, A. Pelliccioli, G. Liberi, P. Plevani, M. Muzi-Falconi, C. S. Newlon and M. Foiani (2001). "The DNA replication checkpoint response stabilizes stalled replication forks." *Nature* 412: 557-561.
237. Lopez-Mosqueda, J., N. L. Maas, Z. O. Jonsson, L. G. Defazio-Eli, J. Wohlschlegel and D. P. Toczyski (2010). "Damage-induced phosphorylation of Sld3 is important to block late origin firing." *Nature* 467(7314): 479-483.
238. Loppin, B., E. Bonnefoy, C. Anselme, A. Laurencon, T. L. Karr and P. Couble (2005). "The histone H3.3 chaperone HIRA is essential for chromatin assembly in the male pronucleus." *Nature* 437(7063): 1386-1390.
239. Loyola, A. and G. Almouzni (2004). "Histone chaperones, a supporting role in the limelight." *Biochim Biophys Acta* 1677(1-3): 3-11.
240. Loyola, A., T. Bonaldi, D. Roche, A. Imhof and G. Almouzni (2006). "PTMs on H3 variants before chromatin assembly potentiate their final epigenetic state." *Mol Cell* 24(2): 309-316.
241. Luger, K. (2003). "Structure and dynamic behavior of nucleosomes." *Curr Opin Genet Dev* 13(2): 127-135.

242. Luger, K. (2006). "Dynamic nucleosomes." *Chromosome Res* 14(1): 5-16.
243. Luger, K., A. W. Mader, R. K. Richmond, D. F. Sargent and T. J. Richmond (1997). "Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution." *Nature* 389(6648): 251-260.
244. Lycan, D. E., M. A. Osley and L. M. Hereford (1987). "Role of transcriptional and posttranscriptional regulation in expression of histone genes in *Saccharomyces cerevisiae*." *Mol. Cell. Biol.* 7: 614-621.
245. Lycan, D. E., M. A. Osley and L. M. Hereford (1987). "Role of transcriptional and posttranscriptional regulation in expression of histone genes in *Saccharomyces cerevisiae*." *Mol Cell Biol* 7(2): 614-621.
246. Lykke-Andersen, J., M. D. Shu and J. A. Steitz (2000). "Human Upf proteins target an mRNA for nonsense-mediated decay when bound downstream of a termination codon." *Cell* 103(7): 1121-1131.
247. Maas, N. L., K. M. Miller, L. G. DeFazio and D. P. Toczyski (2006). "Cell cycle and checkpoint regulation of histone H3 K56 acetylation by Hst3 and Hst4." *Mol Cell* 23(1): 109-119.
248. Maggadottir, S. M. and K. E. Sullivan (2013). "The diverse clinical features of chromosome 22q11.2 deletion syndrome (DiGeorge syndrome)." *J Allergy Clin Immunol Pract* 1(6): 589-594.
249. Magnaghi, P., C. Roberts, S. Lorain, M. Lipinski and P. J. Scambler (1998). "HIRA, a mammalian homologue of *Saccharomyces cerevisiae* transcriptional co-repressors, interacts with Pax3." *Nat Genet* 20(1): 74-77.
250. Mahoney, D. J. and J. R. Broach (1989). "The HML mating-type cassette of *Saccharomyces cerevisiae* is regulated by two separate but functionally equivalent silencers." *Mol Cell Biol* 9(11): 4621-4630.
251. Maison, C. and G. Almouzni (2004). "HP1 and the dynamics of heterochromatin maintenance." *Nat Rev Mol Cell Biol* 5(4): 296-304.
252. Malik, S. M., K. Liu, X. Qiang, R. Sridhara, S. Tang, W. D. McGuinn, Jr., S. L. Verbois, A. Marathe, G. M. Williams, J. Bullock, C. Tornoe, S. C. Lin, T. Ocheltree, M. Vialpando, A. Kacuba, R. Justice and R. Pazdur (2010). "Folotyn (pralatrexate injection) for the treatment of patients with relapsed or refractory peripheral T-cell lymphoma: U.S. Food and Drug Administration drug approval summary." *Clin Cancer Res* 16(20): 4921-4927.

253. Malone, E. A., C. D. Clark, A. Chiang and F. Winston (1991). "Mutations in SPT16/CDC68 suppress cis- and trans-acting mutations that affect promoter function in *Saccharomyces cerevisiae*." *Mol Cell Biol* 11(11): 5710-5717.
254. Mann, B. S., J. R. Johnson, M. H. Cohen, R. Justice and R. Pazdur (2007). "FDA approval summary: vorinostat for treatment of advanced primary cutaneous T-cell lymphoma." *Oncologist* 12(10): 1247-1252.
255. Margueron, R., P. Trojer and D. Reinberg (2005). "The key to development: interpreting the histone code?" *Curr Opin Genet Dev* 15(2): 163-176.
256. Marino-Ramirez, L., I. K. Jordan and D. Landsman (2006). "Multiple independent evolutionary solutions to core histone gene regulation." *Genome Biol* 7(12): R122.
257. Marks, P. A. and R. Breslow (2007). "Dimethyl sulfoxide to vorinostat: development of this histone deacetylase inhibitor as an anticancer drug." *Nat Biotechnol* 25(1): 84-90.
258. Marmorstein, R. (2001). "Structure of histone acetyltransferases." *J Mol Biol* 311(3): 433-444.
259. Martin, M., R. Kettmann and F. Dequiedt (2007). "Class IIa histone deacetylases: regulating the regulators." *Oncogene* 26(37): 5450-5467.
260. Marzluff, W. F., P. Gongidi, K. R. Woods, J. Jin and L. J. Maltais (2002). "The human and mouse replication-dependent histone genes." *Genomics* 80(5): 487-498.
261. Marzluff, W. F., E. J. Wagner and R. J. Duronio (2008). "Metabolism and regulation of canonical histone mRNAs: life without a poly(A) tail." *Nat Rev Genet* 9(11): 843-854.
262. Masumoto, H., D. Hawke, R. Kobayashi and A. Verreault (2005). "A role for cell-cycle-regulated histone H3 lysine 56 acetylation in the DNA damage response." *Nature* 436(7048): 294-298.
263. McKittrick, E., P. R. Gafken, K. Ahmad and S. Henikoff (2004). "Histone H3.3 is enriched in covalent modifications associated with active chromatin." *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(6): 1525-1530.
264. Meeks-Wagner, D. and L. H. Hartwell (1986). "Normal stoichiometry of histone dimer sets is necessary for high fidelity of mitotic chromosome transmission." *Cell* 44: 43-52.
265. Mello, J. A., H. H. Sillje, D. M. Roche, D. B. Kirschner, E. A. Nigg and G. Almouzni (2002). "Human Asf1 and CAF-1 interact and synergize in a repair-coupled nucleosome assembly pathway." *EMBO Rep* 3(4): 329-334.

266. Melo, J. A., J. Cohen and D. P. Toczyski (2001). "Two checkpoint complexes are independently recruited to sites of DNA damage *in vivo*." *Genes Dev* 15(21): 2809-2821.
267. Meluh, P. B. and D. Koshland (1997). "Budding yeast centromere composition and assembly as revealed by *in vivo* cross-linking." *Genes Dev* 11(24): 3401-3412.
268. Meluh, P. B., P. Yang, L. Glowczewski, D. Koshland and M. M. Smith (1998). "Cse4p is a component of the core centromere of *Saccharomyces cerevisiae*." *Cell* 94(5): 607-613.
269. Mendiratta, G., P. R. Eriksson and D. J. Clark (2007). "Cooperative binding of the yeast Spt10p activator to the histone upstream activating sequences is mediated through an N-terminal dimerization domain." *Nucleic Acids Res* 35(3): 812-821.
270. Mersfelder, E. L. and M. R. Parthun (2006). "The tale beyond the tail: histone core domain modifications and the regulation of chromatin structure." *Nucleic Acids Res* 34(9): 2653-2662.
271. Michishita, E., R. A. McCord, E. Berber, M. Kioi, H. Padilla-Nash, M. Damian, P. Cheung, R. Kusumoto, T. L. Kawahara, J. C. Barrett, H. Y. Chang, V. A. Bohr, T. Ried, O. Gozani and K. F. Chua (2008). "SIRT6 is a histone H3 lysine 9 deacetylase that modulates telomeric chromatin." *Nature* 452(7186): 492-496.
272. Michishita, E., R. A. McCord, L. D. Boxer, M. F. Barber, T. Hong, O. Gozani and K. F. Chua (2009). "Cell cycle-dependent deacetylation of telomeric histone H3 lysine K56 by human SIRT6." *Cell Cycle* 8(16): 2664-2666.
273. Miller, K. M., N. L. Maas and D. P. Toczyski (2006). "Taking it off: regulation of H3 K56 acetylation by Hst3 and Hst4." *Cell Cycle* 5(22): 2561-2565.
274. Miller, K. M., J. V. Tjeertes, J. Coates, G. Legube, S. E. Polo, S. Britton and S. P. Jackson (2010). "Human HDAC1 and HDAC2 function in the DNA-damage response to promote DNA nonhomologous end-joining." *Nat Struct Mol Biol* 17(9): 1144-1151.
275. Minucci, S., C. Nervi, F. Lo Coco and P. G. Pelicci (2001). "Histone deacetylases: a common molecular target for differentiation treatment of acute myeloid leukemias?" *Oncogene* 20(24): 3110-3115.
276. Mitchell, P., E. Petfalski, A. Shevchenko, M. Mann and D. Tollervy (1997). "The exosome: a conserved eukaryotic RNA processing complex containing multiple 3'-->5' exoribonucleases." *Cell* 91(4): 457-466.

277. Mizuguchi, G., H. Xiao, J. Wisniewski, M. M. Smith and C. Wu (2007). "Nonhistone Scm3 and histones CenH3-H4 assemble the core of centromere-specific nucleosomes." *Cell* 129(6): 1153-1164.
278. Monson, E. K., D. de Bruin and V. A. Zakian (1997). "The yeast Cac1 protein is required for the stable inheritance of transcriptionally repressed chromatin at telomeres." *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(24): 13081-13086.
279. Morales, V., C. Giamarchi, C. Chailleux, F. Moro, V. Marsaud, S. Le Ricousse and H. Richard-Foy (2001). "Chromatin structure and dynamics: functional implications." *Biochimie* 83(11-12): 1029-1039.
280. Moran, L., D. Norris and M. A. Osley (1990). "A yeast H2A-H2B promoter can be regulated by changes in histone gene copy number." *Genes Dev.* 4: 752-763.
281. Moreira, J. M. A. and S. Holmberg (1999). "Transcriptional repression of the yeast *CHA1* gene requires the chromatin-remodeling complex RSC." *EMBO J.* 18: 2836-2844.
282. Morgan, D. O. (2007). "The Cell Cycle: Principles of Control." London: New Science Press Ltd.: 297 pp.
283. Morrow, D. M., D. A. Tagle, Y. Shiloh, F. S. Collins and P. Hieter (1995). "TEL1, an *S. cerevisiae* homolog of the human gene mutated in ataxia telangiectasia, is functionally related to the yeast checkpoint gene MEC1." *Cell* 82(5): 831-840.
284. Mosammamarast, N., C. S. Ewart and L. F. Pemberton (2002). "A role for nucleosome assembly protein 1 in the nuclear transport of histones H2A and H2B." *EMBO J* 21(23): 6527-6538.
285. Moshkin, Y. M., J. A. Armstrong, R. K. Maeda, J. W. Tamkun, P. Verrijzer, J. A. Kennison and F. Karch (2002). "Histone chaperone ASF1 cooperates with the Brahma chromatin-remodelling machinery." *Genes Dev.* 16: 2621-2626.
286. Mujtaba, S., L. Zeng and M. M. Zhou (2007). "Structure and acetyl-lysine recognition of the bromodomain." *Oncogene* 26(37): 5521-5527.
287. Mullen, T. E. and W. F. Marzluff (2008). "Degradation of histone mRNA requires oligouridylation followed by decapping and simultaneous degradation of the mRNA both 5' to 3' and 3' to 5'." *Genes Dev* 22(1): 50-65.
288. Myung, K., V. Pennaneach, E. S. Kats and R. D. Kolodner (2003). "*Saccharomyces cerevisiae* chromatin-assembly factors that act during DNA replication function in the maintenance of genome stability." *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(11): 6640-6645.

289. Nakada, D., K. Matsumoto and K. Sugimoto (2003). "ATM-related Tel1 associates with double-strand breaks through an Xrs2-dependent mechanism." *Genes Dev* 17(16): 1957-1962.
290. Nakayama, T., K. Nishioka, Y. X. Dong, T. Shimojima and S. Hirose (2007). "Drosophila GAGA factor directs histone H3.3 replacement that prevents the heterochromatin spreading." *Genes Dev* 21(5): 552-561.
291. Narita, M., S. Nunez, E. Heard, M. Narita, A. W. Lin, S. A. Hearn, D. L. Spector, G. J. Hannon and S. W. Lowe (2003). "Rb-mediated heterochromatin formation and silencing of E2F target genes during cellular senescence." *Cell* 113(6): 703-716.
292. Narlikar, G. J., H. Y. Fan and R. E. Kingston (2002). "Cooperation between complexes that regulate chromatin structure and transcription." *Cell* 108(4): 475-487.
293. National Cancer Institute, N. (, 2011). "Tumor Markers." <http://www.cancer.gov/cancertopics/factsheet/detection/tumor-markers>.
294. Natsoulis, G., C. Dollard, F. Winston and J. D. Boeke (1991). "The products of the SPT10 and SPT21 genes of *Saccharomyces cerevisiae* increase the amplitude of transcriptional regulation at a large number of unlinked loci." *New Biol* 3(12): 1249-1259.
295. Natsoulis, G., F. Winston and J. D. Boeke (1994). "The SPT10 and SPT21 genes of *Saccharomyces cerevisiae*." *Genetics* 136(1): 93-9105.
296. Neer, E. J., C. J. Schmidt, R. Nambudripad and T. F. Smith (1994). "The ancient regulatory-protein family of WD-repeat proteins." *Nature* 371(6495): 297-300.
297. Neugeborn, L. and M. Carlson (1984). "Genes affecting the regulation of SUC2 gene expression by glucose repression in *Saccharomyces cerevisiae*." *Genetics* 108(4): 845-858.
298. Nelson, D. M., X. Ye, C. Hall, H. Santos, T. Ma, G. D. Kao, T. J. Yen, J. W. Harper and P. D. Adams (2002). "Coupling of DNA synthesis and histone synthesis in S phase independent of cyclin/cdk2 activity." *Mol Cell Biol* 22: 7459-7472.
299. Neuwald, A. F. and D. Landsman (1997). "GCN5-related histone N-acetyltransferases belong to a diverse superfamily that includes the yeast SPT10 protein." *Trends Biochem Sci* 22(5): 154-155.
300. Ng, H. H., F. Robert, R. A. Young and K. Struhl (2002). "Genome-wide location and regulated recruitment of the RSC nucleosome-remodeling complex." *Genes Dev.* 16: 806-819.

301. Ng, H. H., F. Robert, R. A. Young and K. Struhl (2002). "Genome-wide location and regulated recruitment of the RSC nucleosome-remodeling complex." *Genes Dev* 16(7): 806-819.
302. Ninios, Y. P., K. E. Sekeri-Pataryas and T. G. Sourlingas (2010). "Differential sensitivity of human leukemic cell lines to the histone deacetylase inhibitor, trichostatin A." *Leuk Res* 34(6): 786-792.
303. Nizami, Z., S. Deryusheva and J. G. Gall (2010). "The Cajal body and histone locus body." *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2(7): a000653.
304. Nourani, A., F. Robert and F. Winston (2006). "Evidence that Spt2/Sin1, an HMG-like factor, plays roles in transcription elongation, chromatin structure, and genome stability in *Saccharomyces cerevisiae*." *Mol Cell Biol* 26(4): 1496-1509.
305. Olby, R. (1974). "DNA before Watson--Crick." *Nature* 248(5451): 782-785.
306. Olins, D. E. and A. L. Olins (1972). "Physical studies of isolated eucaryotic nuclei." *J Cell Biol* 53(3): 715-736.
307. Olins, D. E. and A. L. Olins (2003). "Chromatin history: our view from the bridge." *Nat Rev Mol Cell Biol* 4(10): 809-814.
308. Orphanides, G., G. LeRoy, C. H. Chang, D. S. Luse and D. Reinberg (1998). "FACT, a factor that facilitates transcript elongation through nucleosomes." *Cell* 92(1): 105-116.
309. Orsi, G. A., A. Algazeery, R. E. Meyer, M. Capri, L. M. Sapey-Triomphe, B. Horard, H. Gruffat, P. Couble, O. Ait-Ahmed and B. Loppin (2013). "Drosophila Yemanuclein and HIRA cooperate for de novo assembly of H3.3-containing nucleosomes in the male pronucleus." *PLoS Genet* 9(2): e1003285.
310. Orsi, G. A., P. Couble and B. Loppin (2009). "Epigenetic and replacement roles of histone variant H3.3 in reproduction and development." *Int J Dev Biol* 53(2-3): 231-243.
311. Osley, M. A. (1991). "The regulation of histone synthesis in the cell cycle." *Annu Rev Biochem* 60: 827-861.
312. Osley, M. A. (1991). "The regulation of histone synthesis in the cell cycle." *Annual Review of Biochemistry* 60: 827-861.
313. Osley, M. A., J. Gould, S. Kim, M. Y. Kane and L. Hereford (1986). "Identification of sequences in a yeast histone promoter involved in periodic transcription." *Cell* 45(4): 537-544.

314. Osley, M. A. and D. Lycan (1987). "Trans-acting regulatory mutations that alter transcription of *Saccharomyces cerevisiae* histone genes." *Mol Cell Biol* 7(12): 4204-4210.
315. Oudet, P., M. Gross-Bellard and P. Chambon (1975). "Electron microscopic and biochemical evidence that chromatin structure is a repeating unit." *Cell* 4(4): 281-300.
316. Ozdemir, A., S. Spicuglia, E. Lasonder, M. Vermeulen, C. Campsteijn, H. G. Stunnenberg and C. Logie (2005). "Characterization of lysine 56 of histone H3 as an acetylation site in *Saccharomyces cerevisiae*." *J Biol Chem* 280(28): 25949-25952.
317. Paciotti, V., M. Clerici, G. Lucchini and M. P. Longhese (2000). "The checkpoint protein Ddc2, functionally related to *S. pombe* Rad26, interacts with Mec1 and is regulated by Mec1-dependent phosphorylation in budding yeast." *Genes Dev* 14(16): 2046-2059.
318. Pandey, N. B. and W. F. Marzluff (1987). "The stem-loop structure at the 3' end of histone mRNA is necessary and sufficient for regulation of histone mRNA stability." *Mol Cell Biol* 7(12): 4557-4559.
319. Pasini, D., M. Malatesta, H. R. Jung, J. Walfridsson, A. Willer, L. Olsson, J. Skotte, A. Wutz, B. Porse, O. N. Jensen and K. Helin (2010). "Characterization of an antagonistic switch between histone H3 lysine 27 methylation and acetylation in the transcriptional regulation of Polycomb group target genes." *Nucleic Acids Res* 38(15): 4958-4969.
320. Paulovich, A. G. and L. H. Hartwell (1995). "A checkpoint regulates the rate of progression through S-phase in *S. cerevisiae* in response to DNA damage." *Cell* 82: 841-847.
321. Paweletz, N. (2001). "Walther Flemming: pioneer of mitosis research." *Nat Rev Mol Cell Biol* 2(1): 72-75.
322. Pchelintsev, N. A., T. McBryan, T. S. Rai, J. van Tuyn, D. Ray-Gallet, G. Almouzni and P. D. Adams (2013). "Placing the HIRA histone chaperone complex in the chromatin landscape." *Cell Rep* 3(4): 1012-1019.
323. Pellicoli, A., C. Lucca, G. Liberi, F. Marini, M. Lopes, P. Plevani, A. Romano, P. P. Di Fiore and M. Foiani (1999). "Activation of Rad53 kinase in response to DNA damage and its effect in modulating phosphorylation of the lagging strand DNA polymerase." *EMBO J.* 18: 6561-6572.
324. Peterson, C. L. and I. Herskowitz (1992). "Characterization of the yeast SWI1, SWI2, and SWI3 genes, which encode a global activator of transcription." *Cell* 68(3): 573-583.

325. Peterson, C. L. and M. A. Laniel (2004). "Histones and histone modifications." *Curr Biol* 14(14): R546-551.
326. Phillips, D. M. (1963). "The presence of acetyl groups of histones." *Biochem J* 87: 258-263.
327. Pidoux, A. L. and R. C. Allshire (2004). "Kinetochores and heterochromatin domains of the fission yeast centromere." *Chromosome Res* 12(6): 521-534.
328. Pierce, B. (2005). "Genetics: A Conceptual Approach." 2e edition.
329. Potenski, C. J., H. Niu, P. Sung and H. L. Klein (2014). "Avoidance of ribonucleotide-induced mutations by RNase H2 and Srs2-Exo1 mechanisms." *Nature* 511(7508): 251-254.
330. Powell, S. N. and L. A. Kachnic (2003). "Roles of BRCA1 and BRCA2 in homologous recombination, DNA replication fidelity and the cellular response to ionizing radiation." *Oncogene* 22(37): 5784-5791.
331. Prince, H. M., M. J. Bishton and S. J. Harrison (2009). "Clinical studies of histone deacetylase inhibitors." *Clin Cancer Res* 15(12): 3958-3969.
332. Prochasson, P., L. Florens, S. K. Swanson, M. P. Washburn and J. L. Workman (2005). "The HIR corepressor complex binds to nucleosomes generating a distinct protein/DNA complex resistant to remodeling by SWI/SNF." *Genes Dev* 19(21): 2534-2539.
333. Prochasson, P., L. Florens, S. K. Swanson, M. P. Washburn and J. L. Workman (2005). "The HIR corepressor complex binds to nucleosomes generating a distinct protein/DNA complex resistant to remodeling by SWI/SNF." *Genes Dev* 19(21): 2534-2539.
334. Raghuraman, M. K. and B. J. Brewer (2010). "Molecular analysis of the replication program in unicellular model organisms." *Chromosome Res* 18(1): 19-34.
335. Rai, T. S., J. J. Cole, D. M. Nelson, D. Dikovskaya, W. J. Faller, M. G. Vizioli, R. N. Hewitt, O. Anannya, T. McBryan, I. Manoharan, J. van Tuyn, N. Morrice, N. A. Pchelintsev, A. Ivanov, C. Brock, M. E. Drotar, C. Nixon, W. Clark, O. J. Sansom, K. I. Anderson, A. King, K. Blyth and P. D. Adams (2014). "HIRA orchestrates a dynamic chromatin landscape in senescence and is required for suppression of neoplasia." *Genes Dev* 28(24): 2712-2725.
336. Rai, T. S., A. Puri, T. McBryan, J. Hoffman, Y. Tang, N. A. Pchelintsev, J. van Tuyn, R. Marmorstein, D. C. Schultz and P. D. Adams (2011). "Human CABIN1 is a functional

- member of the human HIRA/UBN1/ASF1a histone H3.3 chaperone complex." *Mol Cell Biol* 31(19): 4107-4118.
337. Ray-Gallet, D., J. P. Quivy, C. Scamps, E. M. Martini, M. Lipinski and G. Almouzni (2002). "HIRA is critical for a nucleosome assembly pathway independent of DNA synthesis." *Mol Cell* 9(5): 1091-1100.
338. Reichard, P. (1988). "Interactions between deoxyribonucleotide and DNA synthesis." *Annu Rev Biochem* 57: 349-374.
339. Reis, C. C. and J. L. Campbell (2007). "Contribution of Trf4/5 and the nuclear exosome to genome stability through regulation of histone mRNA levels in *Saccharomyces cerevisiae*." *Genetics* 175(3): 993-991010.
340. Reya, T. and H. Clevers (2005). "Wnt signalling in stem cells and cancer." *Nature* 434(7035): 843-850.
341. Richmond, T. J., J. T. Finch, B. Rushton, D. Rhodes and A. Klug (1984). "Structure of the nucleosome core particle at 7 Å resolution." *Nature* 311(5986): 532-537.
342. Robyr, D., S. K. Kurdistani and M. Grunstein (2004). "Analysis of genome-wide histone acetylation state and enzyme binding using DNA microarrays." *Methods Enzymol* 376: 289-304.
343. Rocha, W. and A. Verreault (2008). "Clothing up DNA for all seasons: Histone chaperones and nucleosome assembly pathways." *FEBS Lett* 582(14): 1938-1949.
344. Rowley, A., R. A. Singer and G. C. Johnston (1991). "CDC68, a yeast gene that affects regulation of cell proliferation and transcription, encodes a protein with a highly acidic carboxyl terminus." *Mol Cell Biol* 11(11): 5718-5726.
345. Rufiange, A., P. E. Jacques, W. Bhat, F. Robert and A. Nourani (2007). "Genome-wide replication-independent histone H3 exchange occurs predominantly at promoters and implicates H3 K56 acetylation and Asf1." *Mol Cell* 27(3): 393-405.
346. Sabatinos, S. A., M. D. Green and S. L. Forsburg (2012). "Continued DNA synthesis in replication checkpoint mutants leads to fork collapse." *Mol Cell Biol* 32(24): 4986-4997.
347. Sager, R. and R. Kitchin (1975). "Selective silencing of eukaryotic DNA." *Science* 189(4201): 426-433.
348. Saha, A., J. Wittmeyer and B. R. Cairns (2002). "Chromatin remodeling by RSC involves ATP-dependent DNA translocation." *Genes Dev* 16(16): 2120-2134.

349. Sakaguchi, K., J. E. Herrera, S. Saito, T. Miki, M. Bustin, A. Vassilev, C. W. Anderson and E. Appella (1998). "DNA damage activates p53 through a phosphorylation-acetylation cascade." *Genes Dev* 12(18): 2831-2841.
350. Sambrook, J., E. F. Fritsch and T. Maniatis (1989). *Molecular Cloning - A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor, New York., Cold Spring Harbor Laboratory Press.
351. Sánchez, R. and W. F. Marzluff (2004). "The oligo(A) tail on histone mRNA plays an active role in translational silencing of histone mRNA during *Xenopus* oogenesis." *Mol. Cell. Biol.* 24: 2513-2525.
352. Sanchez, R. and M. M. Zhou (2009). "The role of human bromodomains in chromatin biology and gene transcription." *Curr Opin Drug Discov Devel* 12(5): 659-665.
353. Sanchez, Y., B. A. Desany, W. J. Jones, Q. Liu, B. Wang and S. J. Elledge (1996). "Regulation of *RAD53* by the ATM-like kinases *MEC1* and *TEL1* in yeast cell cycle checkpoints." *Science* 271: 357-360.
354. Santocanale, C. and J. F. Diffley (1998). "A Mec1- and Rad53-dependent checkpoint controls late-firing origins of DNA replication." *Nature* 395: 615-618.
355. Sarkisian, C. J., B. A. Keister, D. B. Stairs, R. B. Boxer, S. E. Moody and L. A. Chodosh (2007). "Dose-dependent oncogene-induced senescence *in vivo* and its evasion during mammary tumorigenesis." *Nat Cell Biol* 9(5): 493-505.
356. Schermer, U. J., P. Korber and W. Horz (2005). "Histones are incorporated in trans during reassembly of the yeast PHO5 promoter." *Mol Cell* 19(2): 279-285.
357. Schlesinger, M. B. and T. Formosa (2000). "POB3 is required for both transcription and replication in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*." *Genetics* 155(4): 1593-1606.
358. Schmid, A., K. D. Fascher and W. Horz (1992). "Nucleosome disruption at the yeast PHO5 promoter upon PHO5 induction occurs in the absence of DNA replication." *Cell* 71(5): 853-864.
359. Schmidt, M. J., S. West and C. J. Norbury (2011). "The human cytoplasmic RNA terminal U-transferase ZCCHC11 targets histone mRNAs for degradation." *Rna* 17(1): 39-44.
360. Schneider, J., P. Bajwa, F. C. Johnson, S. R. Bhaumik and A. Shilatifard (2006). "Rtt109 is required for proper H3K56 acetylation: a chromatin mark associated with the elongating RNA polymerase II." *J Biol Chem* 281(49): 37270-37274.
361. Scholes, D. T., M. Banerjee, B. Bowen and M. J. Curcio (2001). "Multiple regulators of Ty1 transposition in *Saccharomyces cerevisiae* have conserved roles in genome maintenance." *Genetics* 159(4): 1449-1465.

362. Schwer, B., B. Schumacher, D. B. Lombard, C. Xiao, M. V. Kurtev, J. Gao, J. I. Schneider, H. Chai, R. T. Bronson, L. H. Tsai, C. X. Deng and F. W. Alt (2010). "Neural sirtuin 6 (Sirt6) ablation attenuates somatic growth and causes obesity." *Proc Natl Acad Sci U S A* 107(50): 21790-21794.
363. Serrano, M., A. W. Lin, M. E. McCurrach, D. Beach and S. W. Lowe (1997). "Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a." *Cell* 88(5): 593-602.
364. Sharma, N. L., B. Groselj, F. C. Hamdy and A. E. Kiltie (2013). "The emerging role of histone deacetylase (HDAC) inhibitors in urological cancers." *BJU Int* 111(4): 537-542.
365. Sharp, J. A., E. T. Fouts, D. C. Krawitz and P. D. Kaufman (2001). "Yeast histone deposition protein Asf1p requires Hir proteins and PCNA for heterochromatic silencing." *Curr Biol* 11(7): 463-473.
366. Sharp, J. A., A. A. Franco, M. A. Osley and P. D. Kaufman (2002). "Chromatin assembly factor I and Hir proteins contribute to building functional kinetochores in *S. cerevisiae*." *Genes Dev* 16(1): 85-8100.
367. Shechter, D., H. L. Dormann, C. D. Allis and S. B. Hake (2007). "Extraction, purification and analysis of histones." *Nat Protoc* 2(6): 1445-1457.
368. Shen, X., L. Yu, J. W. Weir and M. A. Gorovsky (1995). "Linker histones are not essential and affect chromatin condensation *in vivo*." *Cell* 82(1): 47-56.
369. Sherwood, P. W. and M. A. Osley (1991). "Histone regulatory (hir) mutations suppress delta insertion alleles in *Saccharomyces cerevisiae*." *Genetics* 128(4): 729-738.
370. Sherwood, P. W., S. V. Tsang and M. A. Osley (1993). "Characterization of HIR1 and HIR2, two genes required for regulation of histone gene transcription in *Saccharomyces cerevisiae*." *Mol Cell Biol* 13(1): 28-38.
371. Shirahige, K., Y. Hori, K. Shiraishi, M. Yamashita, K. Takahashi, C. Obuse, T. Tsurimoto and H. Yoshikawa (1998). "Regulation of DNA replication origins during cell cycle progression." *Nature* 395: 615-621.
372. Shogren-Knaak, M., H. Ishii, J. M. Sun, M. J. Pazin, J. R. Davie and C. L. Peterson (2006). "Histone H4-K16 acetylation controls chromatin structure and protein interactions." *Science* 311(5762): 844-847.

373. Shroff, R., A. Arbel-Eden, D. Pilch, G. Ira, W. M. Bonner, J. H. Petrini, J. E. Haber and M. Lichten (2004). "Distribution and dynamics of chromatin modification induced by a defined DNA double-strand break." *Curr Biol* 14(19): 1703-1711.
374. Sidorova, J. M. and L. L. Breeden (1997). "Rad53-dependent phosphorylation of Swi6 and down-regulation of *CLN1* and *CLN2* transcription occur in response to DNA damage in *Saccharomyces cerevisiae*." *Genes Dev.* 11: 3032-3045.
375. Sidorova, J. M. and L. L. Breeden (2003). "Rad53 checkpoint kinase phosphorylation site preference identified in the Swi6 protein of *Saccharomyces cerevisiae*." *Mol. Cell. Biol.* 23: 3405-3416.
376. Simon, I., J. Barnett, N. Hannett, C. T. Harbison, N. J. Rinaldi, T. L. Volkert, J. J. Wyrick, J. Zeitlinger, D. K. Gifford, T. S. Jaakkola and R. A. Young (2001). "Serial regulation of transcriptional regulators in the yeast cell cycle." *Cell* 106(6): 697-708.
377. Simpson, R. T. (1978). "Structure of the chromatosome, a chromatin particle containing 160 base pairs of DNA and all the histones." *Biochemistry* 17(25): 5524-5531.
378. Singh, R. K., D. Liang, U. R. Gajjalaiahvari, M.-H. M. Kabbaj, J. Paik and A. Gunjan (2010). "Excess histone levels mediate cytotoxicity via multiple mechanisms." *Cell Cycle* 9(20): 4236-4244.
379. Sittman, D. B., R. A. Graves and W. M. Marzluff (1983). "Histone mRNA concentrations are regulated at the level of transcription and mRNA degradation." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80: 1849-1853.
380. Siuti, N. and N. L. Kelleher (2010). "Efficient readout of posttranslational codes on the 50-residue tail of histone H3 by high-resolution MS/MS." *Anal Biochem* 396(2): 180-187.
381. Sive, H. L., N. Heintz and R. G. Roeder (1984). "Regulation of human histone gene expression during the HeLa cell cycle requires protein synthesis." *Mol. Cell. Biol.* 4: 2723-2734.
382. Smith, M. M. and K. Murray (1983). "Yeast H3 and H4 histone messenger RNAs are transcribed from two non-allelic gene sets." *J Mol Biol* 169(3): 641-661.
383. Smith, M. M. and V. B. Stirling (1988). "Histone H3 and H4 gene deletions in *Saccharomyces cerevisiae*." *J Cell Biol* 106(3): 557-566.
384. Smith, T. J. and M. R. Somerfield (1997). "The ASCO experience with evidence-based clinical practice guidelines." *Oncology (Williston Park)* 11(11A): 223-227.

385. Smolka, M. B., C. P. Albuquerque, S. H. Chen and H. Zhou (2007). "Proteome-wide identification of *in vivo* targets of DNA damage checkpoint kinases." *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(25): 10364-10369.
386. Sobel, R. E., R. G. Cook, C. A. Perry, A. T. Annunziato and C. D. Allis (1995). "Conservation of deposition-related acetylation sites in newly synthesized histones H3 and H4." *Proc Natl Acad Sci U S A* 92(4): 1237-1241.
387. Sogo, J. M., M. Lopes and M. Foiani (2002). "Fork reversal and ssDNA accumulation at stalled replication forks owing to checkpoint defects." *Science* 297: 599-602.
388. Sogo, J. M., H. Stahl, T. Koller and R. Knippers (1986). "Structure of replicating simian virus 40 minichromosomes. The replication fork, core histone segregation and terminal structures." *J Mol Biol* 189(1): 189-204.
389. Song, M. G. and M. Kiledjian (2007). "3' Terminal oligo U-tract-mediated stimulation of decapping." *RNA* 13(12): 2356-2365.
390. Song, O. K., X. Wang, J. H. Waterborg and R. Sternglanz (2003). "An Nalpha-acetyltransferase responsible for acetylation of the N-terminal residues of histones H4 and H2A." *J Biol Chem* 278(40): 38109-38112.
391. Spector, M. S., A. Raff, H. DeSilva, K. Lee and M. A. Osley (1997). "Hir1p and Hir2p function as transcriptional corepressors to regulate histone gene transcription in the *Saccharomyces cerevisiae* cell cycle." *Mol Cell Biol* 17(2): 545-552.
392. Spellman, P. T., G. Sherlock, M. Q. Zhang, V. R. Iyer, K. Anders, M. B. Eisen, P. O. Brown, D. Botstein and B. Futcher (1998). "Comprehensive identification of cell cycle-regulated genes of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* by microarray hybridization." *Mol Biol Cell* 9(12): 3273-3297.
393. Steger, D. J. and J. L. Workman (1999). "Transcriptional analysis of purified histone acetyltransferase complexes." *Methods* 19(3): 410-416.
394. Stein, G. H., L. F. Drullinger, R. S. Robotorye, O. M. Pereira-Smith and J. R. Smith (1991). "Senescent cells fail to express *cdc2*, *cycA*, and *cycB* in response to mitogen stimulation." *Proc Natl Acad Sci U S A* 88(24): 11012-11016.
395. Stimson, L. and N. B. La Thangue (2009). "Biomarkers for predicting clinical responses to HDAC inhibitors." *Cancer Lett* 280(2): 177-183.
396. Stimson, L., V. Wood, O. Khan, S. Fotheringham and N. B. La Thangue (2009). "HDAC inhibitor-based therapies and haematological malignancy." *Ann Oncol* 20(8): 1293-1302.

397. Stoler, S., K. C. Keith, K. E. Curnick and M. Fitzgerald-Hayes (1995). "A mutation in CSE4, an essential gene encoding a novel chromatin-associated protein in yeast, causes chromosome nondisjunction and cell cycle arrest at mitosis." *Genes Dev* 9(5): 573-586.
398. Stoler, S., K. Rogers, S. Weitze, L. Morey, M. Fitzgerald-Hayes and R. E. Baker (2007). "Scm3, an essential *Saccharomyces cerevisiae* centromere protein required for G2/M progression and Cse4 localization." *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(25): 10571-10576.
399. Strahl, B. D. and C. D. Allis (2000). "The language of covalent histone modifications." *Nature* 403(6765): 41-45.
400. Su, D., Q. Hu, Q. Li, J. R. Thompson, G. Cui, A. Fazly, B. A. Davies, M. V. Botuyan, Z. Zhang and G. Mer (2012). "Structural basis for recognition of H3K56-acetylated histone H3-H4 by the chaperone Rtt106." *Nature* 483(7387): 104-107.
401. Su, W., S. V. Slepnev, M. K. Slevin, S. M. Lyons, M. Ziemniak, J. Kowalska, E. Darzynkiewicz, J. Jemielity, W. F. Marzluff and R. E. Rhoads (2013). "mRNAs containing the histone 3' stem-loop are degraded primarily by decapping mediated by oligouridylation of the 3' end." *RNA* 19(1): 1-16.
402. Sullivan, E., C. Santiago, E. D. Parker, Z. Dominski, X. Yang, D. J. Lanzotti, T. C. Ingledue, W. F. Marzluff and R. J. Duronio (2001). "*Drosophila* stem loop binding protein coordinates accumulation of histone mRNA with cell cycle progression." *Genes Dev* 15: 173-187.
403. Sullivan, E., C. Santiago, E. D. Parker, Z. Dominski, X. Yang, D. J. Lanzotti, T. C. Ingledue, W. F. Marzluff and R. J. Duronio (2001). "*Drosophila* stem loop binding protein coordinates accumulation of mature histone mRNA with cell cycle progression." *Genes Dev* 15(2): 173-187.
404. Sutton, A., J. Bucaria, M. A. Osley and R. Sternglanz (2001). "Yeast ASF1 protein is required for cell cycle regulation of histone gene transcription." *Genetics* 158(2): 587-596.
405. Sutton, A., J. Bucaria, M. A. Osley and R. Sternglanz (2001). "Yeast Asf1 protein is required for cell cycle regulation of histone gene transcription." *Genetics* 158: 587-596.
406. Swaney, D. L., G. C. McAlister and J. J. Coon (2008). "Decision tree-driven tandem mass spectrometry for shotgun proteomics." *Nat Methods* 5(11): 959-964.
407. Sweeney, F. D., F. Yang, A. Chi, J. Shabanowitz, D. F. Hunt and D. Durocher (2005). "*Saccharomyces cerevisiae* Rad9 acts as a Mec1 adaptor to allow Rad53 activation." *Curr Biol* 15(15): 1364-1375.

408. Tackett, A. J., D. J. Dilworth, M. J. Davey, M. O'Donnell, J. D. Aitchison, M. P. Rout and B. T. Chait (2005). "Proteomic and genomic characterization of chromatin complexes at a boundary." *J Cell Biol* 169(1): 35-47.
409. Tagami, H., D. Ray-Gallet, G. Almouzni and Y. Nakatani (2004). "Histone H3.1 and H3.3 complexes mediate nucleosome assembly pathways dependent or independent of DNA synthesis." *Cell* 116(1): 51-61.
410. Tan, Y., Y. Xue, C. Song and M. Grunstein (2013). "Acetylated histone H3K56 interacts with Oct4 to promote mouse embryonic stem cell pluripotency." *Proc Natl Acad Sci U S A* 110(28): 11493-11498.
411. Tang, Y., M. A. Holbert, H. Wurtele, K. Meeth, W. Rocha, M. Gharib, E. Jiang, P. Thibault, A. Verreault, P. A. Cole and R. Marmorstein (2008). "Fungal Rtt109 histone acetyltransferase is an unexpected structural homolog of metazoan p300/CBP." *Nat Struct Mol Biol* 15(7): 738-745.
412. Tang, Y., M. V. Poustovoitov, K. Zhao, M. Garfinkel, A. Canutescu, R. Dunbrack, P. D. Adams and R. Marmorstein (2006). "Structure of a human ASF1a-HIRA complex and insights into specificity of histone chaperone complex assembly." *Nat Struct Mol Biol* 13(10): 921-929.
413. Tanner, K. G., J. Landry, R. Sternglanz and J. M. Denu (2000). "Silent information regulator 2 family of NAD- dependent histone/protein deacetylases generates a unique product, 1-O-acetyl-ADP-ribose." *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(26): 14178-14182.
414. Tercero, J. A. and J. F. X. Diffley (2001). "Regulation of DNA replication fork progression through damaged DNA by the Mec1/Rad53 checkpoint." *Nature* 412: 553-557.
415. Tercero, J. A., M. P. Longhese and J. F. X. Diffley (2003). "A central role for DNA replication forks in checkpoint activation and response." *Mol. Cell* 11: 1323-1326.
416. Thaminy, S., B. Newcomb, J. Kim, T. Gatbonton, E. Foss, J. Simon and A. Bedalov (2007). "Hst3 is regulated by Mec1-dependent proteolysis and controls the S phase checkpoint and sister chromatid cohesion by deacetylating histone H3 at lysine 56." *J Biol Chem* 282(52): 37805-37814.
417. Tharun, S., W. He, A. E. Mayes, P. Lennertz, J. D. Beggs and R. Parker (2000). "Yeast Sm-like proteins function in mRNA decapping and decay." *Nature* 404(6777): 515-518.
418. Thompson, P. R., D. Wang, L. Wang, M. Fulco, N. Pediconi, D. Zhang, W. An, Q. Ge, R. G. Roeder, J. Wong, M. Levrero, V. Sartorelli, R. J. Cotter and P. A. Cole (2004).

- "Regulation of the p300 HAT domain via a novel activation loop." *Nat Struct Mol Biol* 11(4): 308-315.
419. Tirosh, I. and N. Barkai (2008). "Two strategies for gene regulation by promoter nucleosomes." *Genome Res* 18(7): 1084-1091.
420. Tjeertes, J. V., K. M. Miller and S. P. Jackson (2009). "Screen for DNA-damage-responsive histone modifications identifies H3K9Ac and H3K56Ac in human cells." *EMBO J* 28(13): 1878-1889.
421. Toiber, D., F. Erdel, K. Bouazoune, D. M. Silberman, L. Zhong, P. Mulligan, C. Sebastian, C. Cosentino, B. Martinez-Pastor, S. Giacosa, A. D'Urso, A. M. Naar, R. Kingston, K. Rippe and R. Mostoslavsky (2013). "SIRT6 Recruits SNF2H to DNA Break Sites, Preventing Genomic Instability through Chromatin Remodeling." *Mol Cell* 51(4): 454-468.
422. Townley-Tilson, W. H., S. A. Pendergrass, W. F. Marzluff and M. L. Whitfield (2006). "Genome-wide analysis of mRNAs bound to the histone stem-loop binding protein." *RNA* 12(10): 1853-1867.
423. Tsubota, T., C. E. Berndsen, J. A. Erkmann, C. L. Smith, L. Yang, M. A. Freitas, J. M. Denu and P. D. Kaufman (2007). "Histone H3-K56 acetylation is catalyzed by histone chaperone-dependent complexes." *Mol Cell* 25(5): 703-712.
424. Tsubota, T., C. E. Berndsen, J. A. Erkmann, C. L. Smith, L. Yang, M. A. Freitas, J. M. Denu and P. D. Kaufman (2007). "Histone H3-K56 acetylation is catalyzed by histone chaperone-dependent complexes." *Mol Cell* 25(5): 703-712.
425. Tucker, M., R. R. Staples, M. A. Valencia-Sanchez, D. Muhlrud and R. Parker (2002). "Ccr4p is the catalytic subunit of a Ccr4p/Pop2p/Notp mRNA deadenylase complex in *Saccharomyces cerevisiae*." *EMBO J* 21(6): 1427-1436.
426. Turner, B. M. (1993). "Decoding the nucleosome." *Cell* 75(1): 5-8.
427. Tyler, J. K. (2002). "Chromatin assembly. Cooperation between histone chaperones and ATP-dependent nucleosome remodeling machines." *Eur J Biochem* 269(9): 2268-2274.
428. Tyler, J. K., C. R. Adams, S. R. Chen, R. Kobayashi, R. T. Kamakaka and J. T. Kadonaga (1999). "The RCAF complex mediates chromatin assembly during DNA replication and repair." *Nature* 402(6761): 555-560.
429. van der Heijden, G. W., A. A. Derijck, E. Posfai, M. Giele, P. Pelczar, L. Ramos, D. G. Wansink, J. van der Vlag, A. H. Peters and P. de Boer (2007). "Chromosome-wide nucleosome replacement and H3.3 incorporation during mammalian meiotic sex chromosome inactivation." *Nat Genet* 39(2): 251-258.

430. van Leeuwen, F., P. R. Gafken and D. E. Gottschling (2002). "Dot1p modulates silencing in yeast by methylation of the nucleosome core." *Cell* 109(6): 745-756.
431. VanDemark, A. P., H. Xin, L. McCullough, R. Rawlins, S. Bentley, A. Heroux, D. J. Stillman, C. P. Hill and T. Formosa (2008). "Structural and functional analysis of the Spt16p N-terminal domain reveals overlapping roles of yFACT subunits." *J Biol Chem* 283(8): 5058-5068.
432. Vasilatos, S. N., T. A. Katz, S. Oesterreich, Y. Wan, N. E. Davidson and Y. Huang (2013). "Crosstalk between lysine-specific demethylase 1 (LSD1) and histone deacetylases mediates antineoplastic efficacy of HDAC inhibitors in human breast cancer cells." *Carcinogenesis* 34(6): 1196-1207.
433. Vaze, M. B., A. Pellicioli, S. E. Lee, G. Ira, G. Liberi, A. Arbel-Eden, M. Foiani and J. E. Haber (2002). "Recovery from checkpoint-mediated arrest after repair of a double-strand break requires Srs2 helicase." *Mol Cell* 10: 373-385.
434. Vazquez, M. V., V. Rojas and J. A. Tercero (2008). "Multiple pathways cooperate to facilitate DNA replication fork progression through alkylated DNA." *DNA Repair (Amst)* 7(10): 1693-1704.
435. Vempati, R. K. (2011). "DNA damage in the presence of chemical genotoxic agents induce acetylation of H3K56 and H4K16 but not H3K9 in mammalian cells." *Mol Biol Rep.*
436. Vempati, R. K., R. S. Jayani, D. Notani, A. Sengupta, S. Galande and D. Haldar (2010). "p300-mediated acetylation of histone H3 lysine 56 functions in DNA damage response in mammals." *J Biol Chem* 285(37): 28553-28564.
437. Verreault, A. (2000). "De novo nucleosome assembly: new pieces in an old puzzle." *Genes Dev* 14(12): 1430-1438.
438. Verreault, A., P. D. Kaufman, R. Kobayashi and B. Stillman (1996). "Nucleosome assembly by a complex of CAF-1 and acetylated histones H3/H4." *Cell* 87(1): 95-104.
439. Ververis, K., A. Hiong, T. C. Karagiannis and P. V. Licciardi (2013). "Histone deacetylase inhibitors (HDACIs): multitargeted anticancer agents." *Biologics* 7: 47-60.
440. Vialard, J. E., C. S. Gilbert, C. M. Green and N. F. Lowndes (1998). "The budding yeast Rad9 checkpoint protein is subjected to Mec1/Tel1-dependent hyperphosphorylation and interacts with Rad53 after DNA damage." *EMBO J* 17(19): 5679-5688.

441. Vilenchik, M. M. and A. G. Knudson (2003). "Endogenous DNA double-strand breaks: production, fidelity of repair, and induction of cancer." *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(22): 12871-12876.
442. Vishnoi, N., K. Flaherty, L. C. Hancock, M. E. Ferreira, A. D. Amin and P. Prochasson (2011). "Separation-of-function mutation in HPC2, a member of the HIR complex in *S. cerevisiae*, results in derepression of the histone genes but does not confer cryptic TATA phenotypes." *Biochim Biophys Acta* 1809(10): 557-566.
443. Waterborg, J. H. (2002). "Dynamics of histone acetylation *in vivo*. A function for acetylation turnover?" *Biochem Cell Biol* 80(3): 363-378.
444. Watson, J. D. and F. H. Crick (1953). "Molecular structure of nucleic acids; a structure for deoxyribose nucleic acid." *Nature* 171(4356): 737-738.
445. White, C. L., R. K. Suto and K. Luger (2001). "Structure of the yeast nucleosome core particle reveals fundamental changes in internucleosome interactions." *EMBO J* 20(18): 5207-5218.
446. Widom, J. (1998). "Chromatin structure: linking structure to function with histone H1." *Curr Biol* 8(22): R788-791.
447. Williams, S. K., D. Truong and J. K. Tyler (2008). "Acetylation in the globular core of histone H3 on lysine-56 promotes chromatin disassembly during transcriptional activation." *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(26): 9000-9005.
448. Wilson, B. G. and C. W. Roberts (2011). "SWI/SNF nucleosome remodellers and cancer." *Nat Rev Cancer* 11(7): 481-492.
449. Winston, F., D. T. Chaleff, B. Valent and G. R. Fink (1984). "Mutations affecting Ty-mediated expression of the HIS4 gene of *Saccharomyces cerevisiae*." *Genetics* 107(2): 179-197.
450. Wong, L. H., H. Ren, E. Williams, J. McGhie, S. Ahn, M. Sim, A. Tam, E. Earle, M. A. Anderson, J. Mann and K. H. Choo (2009). "Histone H3.3 incorporation provides a unique and functionally essential telomeric chromatin in embryonic stem cells." *Genome Res* 19(3): 404-414.
451. Woodcock, C. L., J. P. Safer and J. E. Stanchfield (1976). "Structural repeating units in chromatin. I. Evidence for their general occurrence." *Exp Cell Res* 97: 101-110.
452. Wright, W. E. and J. W. Shay (2002). "Historical claims and current interpretations of replicative aging." *Nat Biotechnol* 20(7): 682-688.

453. Wurtele, H., G. S. Kaiser, J. Bacal, E. St-Hilaire, E. H. Lee, S. Tsao, J. Dorn, P. Maddox, M. Lisby, P. Pasero and A. Verreault (2012). "Histone H3 lysine 56 acetylation and the response to DNA replication fork damage." *Mol Cell Biol* 32(1): 154-172.
454. Wyatt, M. D. and D. L. Pittman (2006). "Methylating agents and DNA repair responses: Methylated bases and sources of strand breaks." *Chem Res Toxicol* 19(12): 1580-1594.
455. Xie, W., C. Song, N. L. Young, A. S. Sperling, F. Xu, R. Sridharan, A. E. Conway, B. A. Garcia, K. Plath, A. T. Clark and M. Grunstein (2009). "Histone h3 lysine 56 acetylation is linked to the core transcriptional network in human embryonic stem cells." *Mol Cell* 33(4): 417-427.
456. Xu, F., K. Zhang and M. Grunstein (2005). "Acetylation in histone H3 globular domain regulates gene expression in yeast." *Cell* 121(3): 375-385.
457. Xu, F., K. Zhang and M. Grunstein (2005). "Acetylation in histone H3 globular domain regulates gene expression in yeast." *Cell* 121(3): 375-385.
458. Xu, H., L. Johnson and M. Grunstein (1990). "Coding and noncoding sequences at the 3' end of yeast histone H2B mRNA confer cell cycle regulation." *Mol. Cell. Biol.* 10: 2687-2694.
459. Xu, H., U. J. Kim, T. Schuster and M. Grunstein (1992). "Identification of a new set of cell cycle-regulatory genes that regulate S-phase transcription of histone genes in *Saccharomyces cerevisiae*." *Mol Cell Biol* 12: 5249-5259.
460. Xu, H., U. J. Kim, T. Schuster and M. Grunstein (1992). "Identification of a new set of cell cycle-regulatory genes that regulate S-phase transcription of histone genes in *Saccharomyces cerevisiae*." *Mol Cell Biol* 12(11): 5249-5259.
461. Yan, Y., S. Harper, D. W. Speicher and R. Marmorstein (2002). "The catalytic mechanism of the ESA1 histone acetyltransferase involves a self-acetylated intermediate." *Nat Struct Biol* 9(11): 862-869.
462. Yang, B., B. M. Zwaans, M. Eckersdorff and D. B. Lombard (2009). "The sirtuin SIRT6 deacetylates H3 K56Ac *in vivo* to promote genomic stability." *Cell Cycle* 8(16): 2662-2663.
463. Yang, X. C., M. Purdy, W. F. Marzluff and Z. Dominski (2006). "Characterization of 3'hExo, a 3' exonuclease specifically interacting with the 3' end of histone mRNA." *J Biol Chem* 281(41): 30447-30454.
464. Yang, X. J. (2004). "The diverse superfamily of lysine acetyltransferases and their roles in leukemia and other diseases." *Nucleic Acids Res* 32(3): 959-976.

465. Yang, X. J. and E. Seto (2008). "The Rpd3/Hda1 family of lysine deacetylases: from bacteria and yeast to mice and men." *Nat Rev Mol Cell Biol* 9(3): 206-218.
466. Ye, J., X. Ai, E. E. Eugeni, L. Zhang, L. R. Carpenter, M. A. Jelinek, M. A. Freitas and M. R. Parthun (2005). "Histone H4 lysine 91 acetylation a core domain modification associated with chromatin assembly." *Mol Cell* 18(1): 123-130.
467. Ye, X., B. Zerlanko, A. Kennedy, G. Banumathy, R. Zhang and P. D. Adams (2007). "Downregulation of Wnt signaling is a trigger for formation of facultative heterochromatin and onset of cell senescence in primary human cells." *Mol Cell* 27(2): 183-196.
468. Ye, X., B. Zerlanko, R. Zhang, N. Somaiah, M. Lipinski, P. Salomoni and P. D. Adams (2007). "Definition of pRB- and p53-dependent and -independent steps in HIRA/ASF1a-mediated formation of senescence-associated heterochromatin foci." *Mol Cell Biol* 27(7): 2452-2465.
469. Yekezare, M., B. Gomez-Gonzalez and J. F. Diffley (2013). "Controlling DNA replication origins in response to DNA damage - inhibit globally, activate locally." *J Cell Sci* 126(Pt 6): 1297-1306.
470. Yoshida, M., M. Kijima, M. Akita and T. Beppu (1990). "Potent and specific inhibition of mammalian histone deacetylase both *in vivo* and *in vitro* by trichostatin A." *J Biol Chem* 265(28): 17174-17179.
471. Yu, Y., C. Song, Q. Zhang, P. A. DiMaggio, B. A. Garcia, A. York, M. F. Carey and M. Grunstein (2012). "Histone H3 lysine 56 methylation regulates DNA replication through its interaction with PCNA." *Mol Cell* 46(1): 7-17.
472. Yuan, G. C., Y. J. Liu, M. F. Dion, M. D. Slack, L. F. Wu, S. J. Altschuler and O. J. Rando (2005). "Genome-scale identification of nucleosome positions in *S. cerevisiae*." *Science* 309(5734): 626-630.
473. Yuan, J., M. Pu, Z. Zhang and Z. Lou (2009). "Histone H3-K56 acetylation is important for genomic stability in mammals." *Cell Cycle* 8(11): 1747-1753.
474. Zabaronick, S. R. and J. K. Tyler (2005). "The histone chaperone anti-silencing function 1 is a global regulator of transcription independent of passage through S phase." *Mol Cell Biol* 25(2): 652-660.
475. Zegerman, P. and J. F. Diffley (2009). "DNA replication as a target of the DNA damage checkpoint." *DNA Repair (Amst)* 8(9): 1077-1088.
476. Zegerman, P. and J. F. Diffley (2010). "Checkpoint-dependent inhibition of DNA replication initiation by Sld3 and Dbf4 phosphorylation." *Nature* 467(7314): 474-478.

477. Zeng, L. and M. M. Zhou (2002). "Bromodomain: an acetyl-lysine binding domain." *FEBS Lett* 513(1): 124-128.
478. Zhang, Q., S. Chakravarty, D. Ghersi, L. Zeng, A. N. Plotnikov, R. Sanchez and M. M. Zhou (2010). "Biochemical profiling of histone binding selectivity of the yeast bromodomain family." *PLoS One* 5(1): e8903.
479. Zhang, R., W. Chen and P. D. Adams (2007). "Molecular dissection of formation of senescence-associated heterochromatin foci." *Mol Cell Biol* 27(6): 2343-2358.
480. Zhang, R., M. V. Poustovoitov, X. Ye, H. A. Santos, W. Chen, S. M. Daganzo, J. P. Erzberger, I. G. Serebriiskii, A. A. Canutescu, R. L. Dunbrack, J. R. Pehrson, J. M. Berger, P. D. Kaufman and P. D. Adams (2005). "Formation of MacroH2A-containing senescence-associated heterochromatin foci and senescence driven by ASF1a and HIRA." *Dev Cell* 8(1): 19-30.
481. Zhang, Y., B. Gilquin, S. Khochbin and P. Matthias (2006). "Two catalytic domains are required for protein deacetylation." *J Biol Chem* 281(5): 2401-2404.
482. Zhang, Y., S. Kwon, T. Yamaguchi, F. Cubizolles, S. Rousseaux, M. Kneissel, C. Cao, N. Li, H. L. Cheng, K. Chua, D. Lombard, A. Mizeracki, G. Matthias, F. W. Alt, S. Khochbin and P. Matthias (2008). "Mice lacking histone deacetylase 6 have hyperacetylated tubulin but are viable and develop normally." *Mol Cell Biol* 28(5): 1688-1701.
483. Zhang, Z., Q. Yang, G. Sun, S. Chen, Q. He, S. Li and Y. Liu (2014). "Histone H3K56 acetylation is required for quelling-induced small RNA production through its role in homologous recombination." *J Biol Chem* 289(13): 9365-9371.
484. Zhao, X., A. Chabes, V. Domkin, L. Thelander and R. Rothstein (2001). "The ribonucleotide reductase inhibitor Sml1 is a new target of the Mec1/Rad53 kinase cascade during growth and in response to DNA damage." *EMBO J* 20: 3544-3553.
485. Zhao, X. and R. Rothstein (2002). "The Dun1 checkpoint kinase phosphorylates and regulates the ribonucleotide reductase inhibitor Sml1." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99: 3746-3751.
486. Zhao, X. and R. Rothstein (2002). "The Dun1 checkpoint kinase phosphorylates and regulates the ribonucleotide reductase inhibitor Sml1." *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(6): 3746-3751.
487. Zhao, Z. K., W. Li, M. Y. Wang, L. Zhou, J. L. Wang and Y. F. Wang (2011). "The role of HIRA and maternal histones in sperm nucleus decondensation in the gibel carp and color crucian carp." *Mol Reprod Dev* 78(2): 139-147.

488. Zheng, Y. G., J. Wu, Z. Chen and M. Goodman (2008). "Chemical regulation of epigenetic modifications: opportunities for new cancer therapy." *Med Res Rev* 28(5): 645-687.
489. Zhou, Z. and S. J. Elledge (1993). "DUN1 encodes a protein kinase that controls the DNA damage response in yeast." *Cell* 75(6): 1119-1127.
490. Zou, L. and S. J. Elledge (2003). "Sensing DNA damage through ATRIP recognition of RPA-ssDNA complexes." *Science* 300(5625): 1542-1548.
491. Zunder, R. M., A. J. Antczak, J. M. Berger and J. Rine (2012). "Two surfaces on the histone chaperone Rtt106 mediate histone binding, replication, and silencing." *Proc Natl Acad Sci U S A* 109(3): E144-153.

Annexe I. News & Views

When enough is enough: detrimental effects of excess histones

Valérie Villeneuve and Alain Verreault

DOI: 10.4161/cc.9.24.14062

Comment on: Excess histone levels mediate cytotoxicity via multiple mechanisms.

Singh RK, *et al.* Cell Cycle 2010; 9:4236–44.

The primary function of histones is to help package DNA through formation of nucleosomes and higher-order chromatin structures. Proliferating cells are confronted with the daunting task of coordinating histone and DNA synthesis. During S phase, cells strive to deposit newly synthesized histones immediately behind DNA replication forks (Gasser *et al.* 1996). Several lines of evidence suggest that rapid packaging of nascent DNA into nucleosomes is important to minimize chromosome rearrangements and promote cell survival in response to spontaneous and genotoxic agent-induced DNA lesions that impede replication (Myung *et al.* 2003, Li *et al.* 2008). However, rapid synthesis of new histones to achieve timely packaging of nascent DNA into nucleosomes is an inherently risky business. This is because the total rate of DNA synthesis declines from early to late S phase and abruptly drops when DNA lesions impede replication and activate the intra-S DNA damage checkpoint that suddenly inhibits firing of new replication origins (Santocanale and Diffley 1998). These two physiological conditions lead to an accumulation of excess histones that are not packaged into chromatin.⁵ Because the four canonical core histones (H2A, H2B, H3 and H4) are highly basic proteins (isoelectric points between

11 and 12), they have the potential to bind non-specifically to negatively charged macromolecules that carry genetic information, namely RNA and DNA. Previous studies had revealed that excess histones elevate the incidence of spontaneous mitotic chromosome loss and are cytotoxic to cells treated with genotoxic agents (Meeks-Wagner and Hartwell 1986, Gunjan and Verreault 2003). However, the molecular mechanisms by which excess histones exert their deleterious effects had not been extensively investigated. In a previous issue of *Cell Cycle*, Gunjan and colleagues demonstrate that excess histones bind non-specifically to RNAs, perturb chromatin structure and alter the expression of roughly 4% of yeast RNAs (Singh *et al.* 2010). Fortunately, cells have evolved an arsenal of mechanisms to attenuate the adverse consequences of excess histones. These include histone chaperones involved in nucleosome assembly, which provide a first line of defence by binding to new histones, thus preventing them from interacting non-specifically with nucleic acids. In addition, at least three other cellular responses act in a concerted fashion to limit the accumulation of excess histones in response to DNA damage during S phase: histone gene repression, degradation of histone mRNAs, and degradation of excess histone proteins (Gunjan *et al.* 2006, Marzluff *et al.* 2008). The latter has thus far only been documented in *S. cerevisiae* where degradation of excess histones depends upon the DNA damage response kinase Rad53 (a kinase functionally related to human CHK1 and CHK2) (Gunjan and Verreault 2003). Whether a related mechanism also exists in human cells is currently unknown. Hopefully, the findings reported by Gunjan and colleagues will stimulate further studies of histone homeostasis pathways that contribute to the DNA damage response and the maintenance of genomic stability.

Acknowledgments

Research in A.V.'s laboratory is funded by the Canadian Institutes for Health Research (FRN89928).

Annexe II. Faculty 1000 Prime, Article Recommendation

Valérie Villeneuve, Alain Verreault

<http://f1000.com/prime/4353956>

Comment on: Two-color cell array screen reveals interdependent roles for histone chaperones and a chromatin boundary regulator in histone gene repression

Fillingham J., *et al.* Mol Cell. 2009 Aug 14; 35(3):340-51

Rating: Exceptional

Classification: New finding

Relevant sections: Nuclear Structure and Function, Protein Chemistry & Proteomics

Summary

The authors devised an elegant functional genomics screen to identify activators or repressors of specific gene promoters in *Saccharomyces cerevisiae*. In principle, their strategy can be applied to uncover regulators of any gene promoter. In this manuscript, the authors focussed on regulators of histone promoters and uncovered a number of proteins that have dual roles in nucleosome assembly and regulation of histone gene expression.

Main text

In proliferating cells, the bulk of histone protein synthesis is confined to a short window of time between late G1 and some time during S-phase. This is to ensure that nascent DNA is rapidly packaged into nucleosomes and that excess histones are not produced in the absence of DNA replication either at the end of a normal S-phase or in response to genotoxic agents. This regulation is important because both conditions lead to genome instability and sensitivity to DNA damaging agents. Using a histone gene promoter fused to GFP and a ribosomal protein gene promoter fused to RFP, the authors screened the *S. cerevisiae* collection of non-essential gene mutants by monitoring colony fluorescence. They identified a number of mutants which either enhance the GFP:RFP signal ratio (genes that encode repressors of histone gene transcription) or decrease this ratio (genes that encode activators of histone gene transcription). Interestingly, many of the proteins identified through this screen were known to promote nucleosome assembly (Rtt106, Asf1 and Hir proteins) or acetylate newly synthesised histones (Rtt109, Asf1 and Vps75). Based on chromatin immunoprecipitation assays, the authors demonstrate that repressors of histone gene transcription (Rtt106, Asf1 and the four Hir proteins) localise to *cis*-acting DNA sequences that are necessary to repress histone gene transcription outside of S-phase or when replication abruptly slows down due to DNA damage during S-phase. The results raise interesting issues for future research. For instance, by virtue of their ability to bind new histone proteins, it seems possible that nucleosome assembly factors that repress histone gene transcription serve as “sensors” of the levels of new histones. In this model, Rtt106, Asf1 and Hir proteins would cooperate to shut down histone gene transcription when the levels of new histones reach a certain threshold above which excess histones would start interfering with DNA metabolic processes.