



**HAL**  
open science

# Rôles et régulations de Polo et BubR1 sur les cassures double-brin de l'ADN en mitose

Cedric Landmann

► **To cite this version:**

Cedric Landmann. Rôles et régulations de Polo et BubR1 sur les cassures double-brin de l'ADN en mitose. Médecine humaine et pathologie. Université de Bordeaux, 2017. Français. NNT : 2017BORD0852 . tel-01735235

**HAL Id: tel-01735235**

**<https://theses.hal.science/tel-01735235v1>**

Submitted on 15 Mar 2018

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

# THÈSE

Présentée à

L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX

ÉCOLE DOCTORALE SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTÉ

Par Cédric LANDMANN

POUR OBTENIR LE GRADE DE

DOCTEUR

## Rôles et régulations de Polo et BubR1 sur les cassures double-brin de l'ADN en mitose

SPÉCIALITÉ : *Biologie Cellulaire et Physiopathologie*

Soutenue publiquement le : 15 Décembre 2017

### Membres du jury

Sophie JAVERZAT - PR, Université de Bordeaux, *Président du jury*

Olivier GAVET - MCU, HDR, Université Pierre et Marie Curie, *Rapporteur*

Julien DUMONT - DR2, Université Paris Diderot, *Rapporteur*

Allison BARDIN - DR2, Université Pierre et Marie Curie, *Examineur*

Anne ROYOU - DR2, Université de Bordeaux, *Directrice de thèse*

Emilie MONTEBAULT - CR2, Université de Bordeaux, *Membre invité*



# Remerciements

Le travail de recherche présenté dans cette thèse a été effectué à l'Institut Européen de Chimie et de Biologie sous la direction du docteur Anne ROYOU.

Je remercie Anne pour m'avoir motivé et permis de d'effectuer cette thèse dans son équipe. Je la remercie pour m'avoir encadré, pour m'avoir permis de me former, en biologie mais aussi en microscopie ou en informatique, ainsi que pour la bonne ambiance qu'elle a permis d'instaurer dans l'équipe.

Je remercie également Emilie Montembault, qui m'a initialement recruté dans le laboratoire comme assistant ingénieur, qui m'a conseillé et encadré pendant ces années passées au laboratoire, et qui m'a beaucoup aidé pour l'écriture de ce manuscrit, même pendant ses vacances.

Merci aux collègues, Damien, Jérôme, James, Lou, Macha, Priscillia pour leur aide, pour leur bonne humeur, pour tous les bons moments qu'on a passé ensemble pendant les sorties labo ou pendant les happy-hours.

Merci à ma famille, mes parents, mon frère et mes grands-parents qui m'ont toujours soutenu et qui m'ont permis d'en arriver là.

Merci à tous mes amis. Merci à Malo et Saucisse qui m'ont soutenu dans les moments difficiles. Merci à Hélène pour m'avoir poussé et pour m'avoir fait croire en moi. Merci à Mélissa, avec qui on aura passé des « soirées de folie, etc » à boire du thé et du café lors de la rédaction de la thèse.

Pour finir, je remercie les membres du jury, Sophie JAVERZAT, Olivier GAVET, Julien DUMONT et Allison BARDIN, d'avoir accepté de juger mon travail.



# TABLE DES MATIERES

<b>Introduction</b> .....	1
Chapitre 1 : La mitose, étape du cycle cellulaire .....	3
I. Déroulement du cycle cellulaire et de la mitose.....	3
II. Régulation de la mitose .....	6
A. L'entrée en mitose est sous le contrôle de CDK1 .....	6
B. Sortie de mitose : le rôle de l'APC/C.....	8
1. APC/C et cofacteurs.....	8
2. Dégradations en début d'anaphase par APC/C <sup>CDC20</sup> .....	8
3. Dégradations en fin de mitose par APC/C <sup>CDH1</sup> .....	9
III. La ségrégation des chromosomes .....	10
A. Structure de la chromatine en mitose.....	10
1. Les nucléosomes .....	10
2. Les condensines .....	10
3. Les cohésines .....	11
B. Le fuseau mitotique.....	12
1. Les microtubules.....	12
2. Le centrosome.....	12
3. Autres centres de nucléations des microtubules .....	13
4. Facteurs facilitant la formation du fuseau mitotique .....	13
5. Le fuseau mitotique .....	14
C. Le kinétochore.....	15
1. Structure du kinétochore .....	16
a. Centromère.....	16
b. Inner kinétochore .....	17
c. Outer kinétochore.....	17

d. Corona fibreuse.....	19
2. Fonctions du kinétochore.....	19
a. Interaction kinétochore-microtubules .....	19
b. Correction de l'attachement kinétochore-microtubules.....	20
c. Point de contrôle du fuseau mitotique (SAC) .....	22
i. Composants du SAC.....	22
ii. Mise en place du SAC .....	23
iii. Inhibition de l'APC/C.....	24
iiii. Inactivation du SAC .....	26
Chapitre 2 : Les régulateurs mitotiques .....	29
I. La famille des Polo-like kinases (Plks) .....	29
A. Structure.....	29
B. Activation de Polo.....	31
C. Localisation de Polo au cours du cycle cellulaire .....	32
1. Recrutement au centrosome.....	33
2. Recrutement au kinétochore .....	33
3. Recrutement sur les microtubules.....	34
4. Recrutement sur le site d'abscission .....	34
D. Rôles de Polo .....	35
1. Régulation de l'entrée en mitose .....	35
2. Régulation de l'APC/C .....	35
3. Fonctions aux centrosomes.....	36
4. Fonctions aux centromères/kinétochores.....	36
5. Cohésion des chromatides sœurs .....	37
6. Cytocinèse et abscission .....	38
II. BubR1 .....	38
A. Structure de BubR1.....	39
1. Domaine KEN.....	39
2. Domaine "Bub3 Binding Domain" .....	40

3. Phe-box et D-box .....	40
4. Domaine 3 .....	40
5. Domaine KARD .....	40
6. Domaine kinase.....	41
B. Localisation de BubR1 à travers le cycle cellulaire .....	42
1. Recrutement de BubR1 aux kinétochores.....	42
2. Les rôles de BubR1 .....	43
a. Le rôle de BubR1 dans le SAC .....	43
b. Le rôle de BubR1 dans l'attachement kinétochore-microtubules.....	44
i. Phosphorylation du domaine KARD .....	45
ii. Phosphorylation du domaine kinase .....	45
c. Le rôle de BubR1 dans la régulation de la durée de la mitose.....	46
d. Les fonctions non mitotiques de BubR1 .....	46
III. Aurora B et le Chromosomal Passenger Complex .....	47
A. Localisation et recrutement du CPC .....	47
1. Localisation sur les chromosomes et au centromère .....	48
2. Localisation au fuseau central.....	48
3. Localisation au site d'abscission.....	49
B. Activation de Aurora B .....	49
C. Fonctions de Aurora B .....	50
1. Régulation de la condensation des chromosomes.....	50
2. Correction des attachements kinétochore-microtubules incorrects .....	50
3. Régulation du Spindle Assembly Checkpoint (SAC).....	51
4. Formation et stabilisation du fuseau central .....	51
5. Assemblage de l'anneau contractile .....	52
6. Cytocinèse.....	52
Chapitre 3 : La réponse aux dommages à l'ADN.....	53
I. Les différents types de dommages à l'ADN.....	53



A. Dommage au niveau des bases de l'ADN.....	53
B. Les pontages intra- et inter-brin .....	54
C. Les cassures simple-brin de l'ADN .....	54
D. Les cassures double-brin de l'ADN.....	55
II. La réponse aux dommages à l'ADN (DDR ou DNA Damage Response).....	55
A. Mise en place de la DDR .....	55
B. La chromatine au cours de la DDR .....	56
1. Modification des histones .....	57
2. Recrutement d'autres protéines sur la chromatine endommagée .....	57
C. La réparation des cassures double-brin .....	58
1. La jonction des extrémités non-homologues (NHEJ).....	58
2. La recombinaison homologue (HR) .....	59
B. Le checkpoint de dommage à l'ADN (DNA damage checkpoint) .....	61
1. La mise en place du DNA damage checkpoint.....	61
a. DNA damage checkpoint en G1 .....	61
b. DNA damage checkpoint en S et G2 .....	61
2. L'extinction de la DDR.....	62
3. L'adaptation au DNA damage checkpoint.....	63
4. Prise en charge des DSBs pendant la mitose .....	64
a. Inhibition de la HR.....	64
b. Inhibition de la NHEJ .....	64
c. Inhibition du DNA damage checkpoint .....	65
Chapitre 4 : Problématiques et objectifs de thèses .....	67
<b>Résultats</b> .....	69
I. Article 1 : Bub3–BubR1-dependent sequestration of Cdc20 <sup>Fizzy</sup> at DNA breaks facilitates the correct segregation of broken chromosomes.....	71
II. Article 2 : Mre11-Rad50-Nbs1 and ATM mediate the robust recruitment of Polo and BubR1/ Bub3 to DNA breaks during mitosis .....	92
III. Résultats complémentaires .....	131

A. Le CPC est recruté sur les cassures de chromosomes en mitose .....	131
B. Les sites d'attache de Bub3 aux motifs MELT sont nécessaires au recrutement efficace de Bub3 sur les cassures de chromosomes.....	135
C. Rôle des sites putatifs de phosphorylation par Polo sur le Bub3 binding domain de BubR1 .....	137
<b>Discussion et conclusion .....</b>	<b>143</b>
I. Mécanisme de recrutement de Polo sur les cassures .....	145
A. Les condensines .....	145
B. ATM.....	146
C. Identification de protéines permettant le recrutement de Polo.....	146
II. Mécanisme de recrutement de BubR1, Bub3 et CDC20 aux cassures en mitose .....	147
A. Régulation du recrutement du complexe via Bub3 .....	148
B. Régulation du recrutement du complexe via BubR1 .....	148
III. Régulation du complexe BubR1, Bub3 et CDC20 sur les cassures de chromosomes.....	149
A. Inhibition locale de l'APC/C par BubR1, Bub3 et CDC20.....	149
B. Régulation de la dissociation du complexe BubR1, Bub3 et CDC20.....	150
C. Régulation de la dissociation du complexe BubR1, Bub3 et CDC20 par la dégradation de CDC20.....	151
IV. Fonctions de Polo, BubR1 et Bub3 sur les cassures.....	151
A. Préserver la compaction de la chromatine au niveau des cassures .....	151
B. Favoriser la décaténation de la chromatine au niveau des cassures.....	152
C. Protéger les condensines de la dégradation.....	153
V. Recrutement et rôle de Aurora B aux cassures .....	153
VI. Conclusion générale .....	154
<b>Références bibliographiques .....</b>	<b>155</b>

# LISTE DES FIGURES

## Introduction

**Figure 1 :** Déroulement du cycle cellulaire.

**Figure 2 :** Voie de signalisation contrôlant l'activité de CDK1/CyclineB

**Figure 3 :** Le complexe cohésine et ses régulateurs.

**Figure 4 :** Le fuseau mitotique est un réseau bipolaire de microtubules.

**Figure 5 :** Schéma représentant le complexe KMN.

**Figure 6 :** Les différentes configurations d'attachement possibles des kinétochores aux microtubules.

**Figure 7 :** Schéma simplifié de la mise en place du SAC et de l'inhibition de l'APC/C.

**Figure 8 :** Schéma simplifié de l'extinction du SAC et de la dégradation de la cycline B et de la séparase.

**Figure 9 :** Les différents domaines de Polo.

**Figure 10 :** Mécanisme basique de l'activité de Polo.

**Figure 11 :** Les différents domaines de BubR1.

**Figure 12 :** HR et NHEJ.

## Résultats

### II. Article 2

**Figure 1 :** Polo, BubR1, Bub3 and Fizzy are recruited to laser-induced DNA breaks in mitosis.

**Figure 2** : Polo is recruited to DNA breaks in mitosis before BubR1/Bub3/Fizzy and remains on the breaks well into the next interphase.

**Figure 3** : Polo mediates the efficient recruitment of BubR1/Bub3 to DNA breaks.

**Figure 4** : BubR1, Bub3 and Polo recruitment to DNA breaks does not require microtubule polymerization.

**Figure 5** : Mre11 recruitment to DNA breaks in mitosis precedes Polo.

**Figure 6** : The robust recruitment of Polo, BubR1 and Bub3 to DNA breaks in mitosis depends on Rad50 and ATM, independently of H2Az phosphorylation.

**Figure 7** : Ectopic localization of Mre11 on chromatin is sufficient to recruit Polo independently of DNA damage.

**Figure S1** : The Polo-dependent phosphorylation residues of the BubR1 KARD sequence are not required for the recruitment of BubR1 to DSB.

**Figure S2** : Okra does not localize on laser-induced DSB during mitosis.

### III. Résultats complémentaires

**Figure 1** : Polo mediates the efficient recruitment of Aurora B to DNA breaks.

**Figure 2** : The robust recruitment of Bub3 to DNA breaks in mitosis depends on Bub3-MELT binding sites.

**Figure 3** : The threonines 622 and 731 in the Bub3-BD are important for the efficient recruitment of BubR1 to DSB.

## **LISTE DES ABRÉVIATIONS**

ADN : Acide DésoxyriboNucléique  
APC/C : Anaphase Promoting Complexe/Cyclosome  
ATM : Ataxia Telangiectasia Mutated  
ATR : Ataxia Telangiectasia and Rad3-related protein  
BBC : BubR1-Bub3-CDC20  
BRCA1 : Breast Cancer Associated Gene 1  
BUB : Budding Uninhibited by Benomyl  
BUBR1 : BUB1-Related 1  
CCAN : Constitutive Centromere Associated Network  
CDC : Cell Division Cycle  
CDK1 : Cyclin dependent kinase 1  
CENP : Centromeric Protein  
Chk1 : Checkpoint Kinase 1  
CPC : Chromosomal Passenger Complex  
DSB : Double Strand Break  
HR : Homologous Recombination  
KARD : Kinetochore Attachment Regulatory Domain  
KMN : Knl1, Mis12, Ndc80  
MAD : Mitotic Arrest Deficient  
MCC : Mitotic Checkpoint Complex  
MELT : Met-Glu-Leu-Thr  
MPS1 : Monopolar Spindle 1  
MRN : Mre11, Rad50 et NBS1  
NHEJ : Non Homologous End Joining  
PBD : Polo Box Domain  
PIBP1 : Polo-Box Interacting Protein 1  
PLK1 : Polo-like kinase 1  
PP1 : Protein Phosphatase 1  
SAC : Spindle Assembly Checkpoint  
SMC : Structural Maintenance of Chromosomes  
TPR : Tetratricopeptide Repeats

# **Introduction**



# Chapitre 1 : La mitose, étape du cycle cellulaire

Le cycle cellulaire est le processus permettant la prolifération des organismes unicellulaires, et le développement et la régénération des organismes pluricellulaires.

## I. Déroulement du cycle cellulaire et de la mitose

Chez les eucaryotes, ce cycle commence par la phase G1 (Gap1) durant laquelle la cellule grossit et produit les protéines qui seront ensuite nécessaires à la duplication de son génome en phase S (phase de synthèse). En phase G2 (Gap2), la cellule synthétise les protéines qui seront nécessaires lors de la mitose. Ces trois phases G1, S, et G2 composent l'interphase au cours de laquelle le génome est répliqué et parallèlement le centrosome est dupliqué (figure 1 a, b et c).

La mitose est l'étape durant laquelle la cellule sépare son génome répliqué pour former deux cellules filles génétiquement identiques. Elle est communément divisée en 5 phases au cours desquelles des changements morphologiques précis se déroulent, concernant l'état de condensation de la chromatine/des chromosomes, l'organisation du fuseau mitotique et la structure de l'enveloppe nucléaire. Chez certains eucaryotes unicellulaires tels que les levures, la séparation des chromatides sœurs se fait sans rupture de l'enveloppe nucléaire, la mitose est dite fermée. Chez les métazoaires, l'enveloppe nucléaire se fragmente lorsque les cellules rentrent en mitose et se reforme à la sortie de mitose. La mitose est dite ouverte.

La mitose commence par la **prophase**, pendant laquelle la chromatine se condense pour former les chromosomes composés chacun de deux chromatides sœurs. A cette étape, la cohésine, un complexe protéique qui maintient la cohésion entre les chromatides sœurs, est clivée le long des bras des chromatides sœurs et n'est maintenue qu'au niveau des centromères. Parallèlement, l'enveloppe nucléaire (NEB : Nuclear Envelope Breakdown) se dissocie et les centrosomes préalablement dupliqués se séparent et migrent chacun à un pôle de la cellule (Figure 1 d).

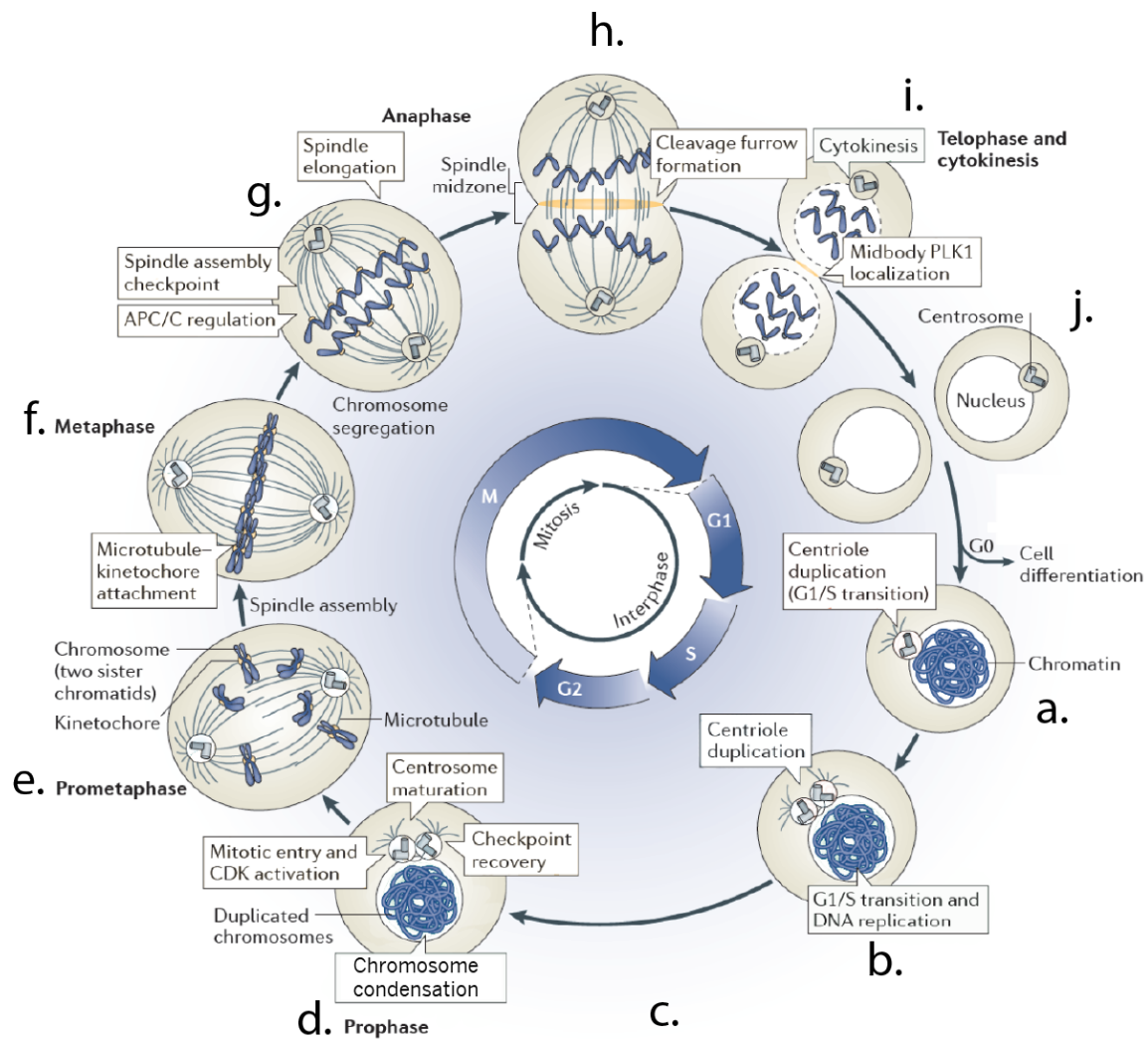


Lors de la **prométaphase**, les microtubules émanant des centrosomes vont former le fuseau mitotique bipolaire. Les microtubules s'attachent aux chromosomes au niveau d'un complexe protéique, appelé kinétochore qui se forme au niveau du centromère de chaque chromatide soeur. Ainsi, les tensions exercées par les microtubules permettent aux chromosomes de congresser vers l'équateur de la cellule (Figure 1 e).

La **métaphase** correspond au stade au cours duquel les chromosomes sont tous alignés à l'équateur et attachés de façon bipolaire au fuseau mitotique (Figure 1 f). L'attachement des kinétochores aux microtubules est sous la surveillance du point de contrôle de l'assemblage du fuseau mitotique (Spindle Assembly Checkpoint : SAC ; voir section "c. Point de contrôle du fuseau mitotique (SAC)" p22). Il bloque la progression de la mitose tant que les kinétochores ne sont pas tous attachés correctement au fuseau mitotique.

Une fois les chromosomes correctement attachés et sous tension, le SAC est inactivé et la cellule passe en **anaphase**. L'anaphase se déroule en deux phases. En anaphase A, la cohésion des chromatides sœurs au niveau des centromères est rompue par dégradation des cohésines. Les chromatides sœurs migrent vers les pôles opposés de la cellule sous l'action des microtubules kinétochoriens qui se raccourcissent par dépolymérisation (Figure 1 g). En anaphase B, le fuseau mitotique s'allonge et un faisceau de microtubules, appelé fuseau central se met en place entre les deux futures cellules filles. Ces microtubules participent à la mise en place et au positionnement du site de division. En effet, un anneau contractile composé en majorité d'actine et de myosine, et ancré à la membrane plasmique, s'assemble sous l'action d'un complexe localisé sur les microtubules du fuseau central. La myosine en glissant sur les câbles d'actine génère des forces qui permettent la contraction de cet anneau et l'invagination progressive de la membrane entre les deux cellules filles (Figure 1 h).

Enfin, la mitose se termine par la **télophase** durant laquelle l'enveloppe nucléaire se reforme et les chromosomes se décondensent. La membrane plasmique est alors complètement invaginée et la séparation physique des deux cellules filles se produit au cours d'une étape de la cytokinèse appelée abscission (Figure 1 i et j).



**Figure 1 : Déroulement du cycle cellulaire.** (a) Phase G1 : les centrioles initient leur duplication (b) Phase S : l'ADN se réplique. (c) Phase G2 : la cellule synthétise les protéines qui seront nécessaires lors de la mitose. (d) Prophase : les chromosomes se condensent et l'enveloppe nucléaire disparaît. (e) Prométaphase : capture des chromosomes par les microtubules. (f) Métaphase : alignement des chromosomes sur la plaque métaphasique. (g) Anaphase A : les chromatides se séparent et migrent vers les pôles. (h) Anaphase B : mise en place du fuseau central et formation de l'anneau contractile au niveau du site de division. (i) Télaphase : les chromosomes se décondensent et l'enveloppe nucléaire se reforme. (j) Cytokinèse : division du cytoplasme et séparation physique des cellules filles. (Modifié de Zitouni et al. 2014)

## II. Régulation de la mitose

La mitose est un processus finement régulé. Elle est principalement contrôlée par deux mécanismes moléculaires : la phosphorylation et la protéolyse.

Les réactions de phosphorylations sont assurées par de nombreuses kinases, dont CDK1 (Cyclin dependent kinase 1), PLK1 (Polo-like kinase 1 appelée Polo chez la drosophile) et les kinases Aurora (Aurora A et Aurora B). Ces réactions de phosphorylation sont contrecarrées par les actions des phosphatases telles PP1 (Protein Phosphatase 1) et PP2A (Protein Phosphatase 2 A). L'équilibre entre l'état de phosphorylation et déphosphorylation de nombreux substrats de ces kinases et phosphatases contrôle la progression de la cellule en mitose.

En mitose, les réactions de protéolyses sont contrôlées par des E3 ubiquitine-ligases dont la principale est l'APC/C (Anaphase Promoting Complexe/Cyclosome). Les substrats ubiquitinés séquentiellement par l'APC/C accompagné de ses co-facteurs sont ensuite dégradés par le protéasome, ce qui permet la progression de la cellule en mitose. L'APC/C en mitose permet ainsi l'inhibition de CDK1 et la suppression de la cohésion des chromatides sœurs lors notamment du passage des cellules en anaphase.

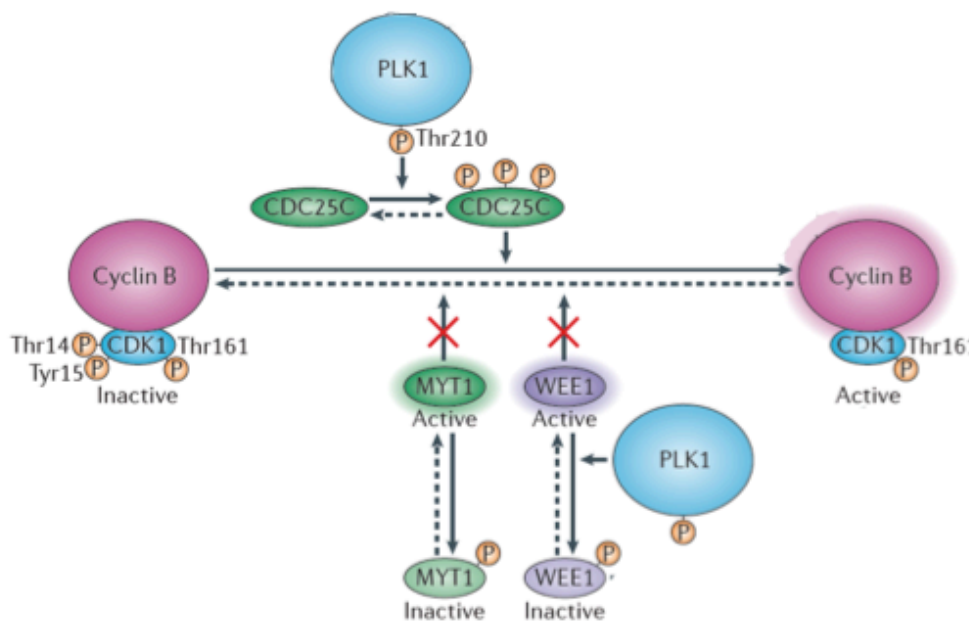
### A. L'entrée en mitose est sous le contrôle de CDK1

Les CDKs (Cyclin-dependent kinases) font partie d'une famille de sérine/thréonine kinases qui sont les régulateurs majeurs du cycle cellulaire. Ces kinases sont activées par deux événements, l'interaction avec une sous-unité régulatrice de la famille des cyclines et la déphosphorylation de leur domaine kinase au niveau du site actif. En mitose, la kinase prédominante de cette famille est CDK1 activée par les sous-unités cycline A jusqu'en prométaphase et cycline B jusqu'en anaphase. De part son action majeure en mitose, le complexe CDK1/Cycline B est également connu sous le nom de MPF (M-phase promoting factor) (Labbe et al. 1989; Lohka, Hayes, and Maller 1988).

L'activité du complexe CDK1/cycline B est finement contrôlée. Avant la mitose, le complexe CDK1/Cycline B est maintenu inactif par l'activité des kinases WEE1 (Parker and Piwnicka-Worms 1992) et MYT1 qui phosphorylent CDK1 au niveau de son site actif

sur des résidus tyrosine et thréonine (Tyr14 et Thr15 respectivement chez l'humain). Ce pool de CDK1 phosphorylé est activé par la phosphatase CDC25 qui déphosphoryle les résidus Tyr14 et Thr15 en G2, avant la rupture de l'enveloppe nucléaire (NEB : Nuclear Enveloppe Breakdown) (Fantes 1979; Edgar and O'Farrell 1989; Potapova et al. 2009). Cette activation est contrôlée par la kinase Polo qui, par phosphorylation, active CDC25 et inhibe WEE1 (Vincent Archambault and Glover 2009) (Figure 2).

Le complexe CDK1/Cycline B activé phosphoryle ensuite de nombreux substrats afin de réorganiser l'architecture de la cellule pour réguler le processus de la mitose. Par exemple, CDK1 phosphoryle la sous-unité régulatrice CAP-D3 du complexe condensine II (voir section "2. Les condensines" p10) afin de promouvoir la compaction des chromosomes, la  $\beta$ -tubuline afin de réguler la dynamique des microtubules, ainsi que différents substrats pour la NEB (Abe et al. 2011; Fourest-lieuvain et al. 2005; Hara et al. 2006).



**Figure 2 : Voie de signalisation contrôlant l'activité de CDK1/Cycline B.** En G2, les kinases WEE1 et MYT1 inhibent CDK1 par phosphorylation sur Thr14 et Tyr15. La phosphatase CDC25 contrecarre les effets de WEE1 et MYT en déphosphorylant Thr14 et Tyr15 et active ainsi la complexe CDK1/Cycline B. Polo est activée par phosphorylation sur sa T-loop (Thr210), puis active CDC25 et inactive WEE1 et MYT1 par phosphorylation (Modifié de Zitouni et al. 2014).

## B. Sortie de mitose : le rôle de l'APC/C

### 1. APC/C et cofacteurs

L'évènement majeur menant à la sortie de la mitose est l'activation de l'APC/C («Anaphase Promoting Complexe/Cyclosome). L'APC/C est une E3 ubiquitine ligase qui fixe des groupements ubiquitines sur ses substrats. Les substrats ubiquitinés sont alors reconnus et détruits par le protéasome 26S.

Chez les vertébrés, l'APC/C est composée de 14 sous-unités et fonctionne avec l'un de ses deux co-facteurs, CDC20 et/ou CDH1 (respectivement Fizzy et Fizzy-related chez la drosophile) (Chang et al. 2014). CDC20 et CDH1 ont pour rôle de reconnaître les substrats de l'APC/C et possèdent des affinités spécifiques envers certains substrats. De plus, ces sous-unités font le lien entre l'APC/C et ses substrats. Plus précisément, le domaine WD40 situé dans l'extrémité C-terminale des co-facteurs interagit avec des domaines retrouvés dans les substrats de l'APC/C tels que les D-Box et les KEN-Box. CDC20 et CDH1 interagissent avec des séquences TPR (tetratricopeptide repeats) présentes sur certaines sous-unités de l'APC/C (Kraft et al. 2005; Janet L. Burton and Solomon 2001; Chang et al. 2014).

CDC20 est la sous-unité de l'APC/C durant la mitose jusqu'en anaphase, alors que CDH1 est la sous-unité de l'APC/C en fin de mitose jusqu'à la transition G1-S (Revue : Peters 2006). L'interaction entre l'APC/C et ses co-facteurs est régulée temporellement par des réactions de phosphorylation effectuées par les kinases PLK1 et CDK1. La phosphorylation de l'APC/C favorise l'interaction entre l'APC/C et CDC20 alors que la phosphorylation de CDH1 inhibe son interaction avec l'APC/C (Kramer et al. 2000; S. Zhang et al. 2016).

### 2. Dégradations en début d'anaphase par APC/C<sup>CDC20</sup>

Les deux substrats majeurs ciblés par l'APC/C sont la sécurine et la cycline B (Thornton and Toczyski 2003). Leur dégradation induit l'initiation de l'anaphase puis la sortie de la mitose.

En effet, en début de mitose, après clivage des cohésines des bras des chromatides sœurs, les chromatides sœurs ne sont liées entre elles qu'au niveau du centromère. Avant l'anaphase, la cohésion des chromatides sœurs au niveau du centromère est préservée par la sécurine. Cette protéine inhibe l'activité de la séparase, une protéase qui est responsable du clivage de la sous-unité Rad21 du complexe cohésine (voir section "3. La cohésine" p11) (Uhlmann, Lottspeich, and Nasmyth 1999; Zou et al. 1999). L'ubiquitination de la sécurine par le complexe APC/C<sup>CDC20</sup> et sa dégradation consécutive par le protéasome permet la libération de la séparase et le clivage de Rad21 du complexe cohésine, supprimant ainsi la cohésion entre les chromatides sœurs (Bastians et al. 1999). Celles-ci peuvent alors ségréger vers les pôles opposés de la cellule mère (Revue : Agarwal and Cohen-Fix 2002).

D'autre part, la dégradation de la cycline B par le complexe APC/C<sup>CDC20</sup> provoque l'inactivation de la kinase CDK1 (Sudakin et al. 1995). L'activité des phosphatases PP1 et PP2A permet la déphosphorylation des substrats de CDK1, induisant ainsi le désassemblage du fuseau mitotique, la formation du sillon de division, la décondensation des chromosomes et la reformation de l'enveloppe nucléaire (Axton et al. 1990; Ferrigno, Langan, and Cohen 1993).

### 3. Dégradations en fin de mitose par APC/C<sup>CDH1</sup>

En fin de mitose, le second co-facteur de l'APC/C, CDH1 qui était inactivé par CDK1, est déphosphorylé par CDC14 et remplace CDC20 en tant que co-activateur de l'APC/C (J. N. Huang et al. 2001). L'APC/C<sup>CDH1</sup> reconnaît et ubiquitine d'autres substrats tels que les protéines mitotiques PLK1, les kinases Aurora et CDC20, et induit leur dégradation plus tardivement au cours de la mitose, permettant ainsi la poursuite du cycle cellulaire (Kramer et al. 2000; Hyun et al. 2013; Lindon and Pines 2004; Floyd, Pines, and Lindon 2008).

### III. La ségrégation des chromosomes

Au cours de la mitose, les chromosomes ségrègent à chaque pôle de la cellule grâce aux microtubules du fuseau mitotique, qui viennent s'attacher sur la partie centromérique des chromosomes, au niveau des kinétochores des chromatides soeurs.

#### A. Structure de la chromatine en mitose

En mitose, la chromatine est condensée grâce aux histones et à aux condensines pour former les chromosomes. Chaque chromosome est constitué d'une paire de chromatides soeurs reliées entre elles par la cohésine, présente sur toute leur longueur pendant les premières phases de la mitose, puis au niveau du centromère seulement, jusqu'à l'anaphase.

##### 1. Les nucléosomes

L'unité de base des génomes eucaryotes est le nucléosome, qui correspond à environ 150 paires de bases d'ADN enroulées autour d'un octamère d'histones contenant deux exemplaires de chacune des histones H2A, H2B, H3 et H4 (Revue : Mariño-Ramírez et al. 2005). Ce complexe permet la compaction de l'ADN. Il existe différents niveaux de compaction de l'ADN selon les régions chromosomiques et selon le stade du cycle cellulaire.

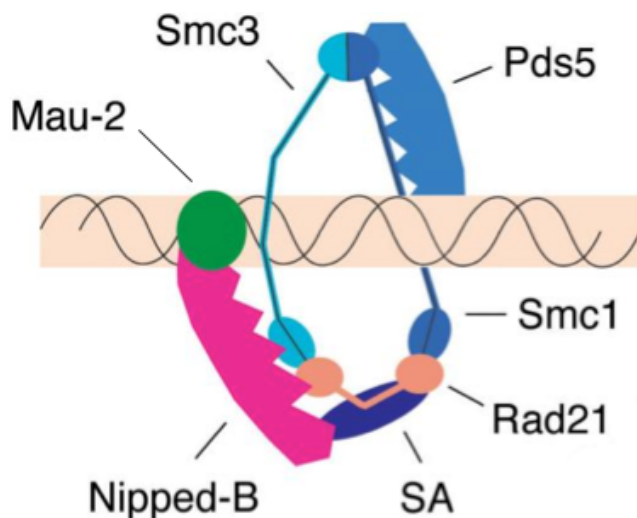
##### 2. Les condensines

Les condensines peuvent être de type I ou II. Chaque type contient deux complexes : l'un, composé de deux sous-unités principales SMC2 et SMC4, possède l'activité ATPase et est commun aux deux types de condensine, et l'autre contenant trois sous-unités régulatrices nommées CAP-D2, CAP-G et CAP-H (Barren chez la drosophile) pour la condensine de type I, et CAP-D3, CAP-G2 et CAP-H2 pour la condensine II. La condensine

Il ne semble pas exister chez la drosophile (Green et al. 2012). Les condensines sont requises pour la condensation des chromosomes pendant la mitose (Herzog et al. 2013).

### 3. La cohésine

La cohésine est un complexe très conservé des bactéries aux eucaryotes. Elle est composée de quatre sous-unités qui sont nommées Smc1 (Structural maintenance of chromosomes 1), Smc3 (Structural maintenance of chromosomes 3), Rad21 et SA (Stromalin) chez la drosophile (Revue : Cobbe and Heck 2000; Revue : Dorsett 2009). Ce complexe maintient la cohésion des chromatides sœurs en formant un anneau autour des brins d'ADN afin de les maintenir ensemble. D'autres protéines entrent en jeu dans la cohésion des chromatides. Nipped-B et Mau-2, sont requises pour l'association entre les cohésines et les chromosomes, et PDS5 participe à la mise en place et au maintien de la cohésion des chromatides sœurs (Ciosk et al. 2000; Muir et al. 2016) (Figure 3).



**Figure 3 : Le complexe cohésine et ses régulateurs.** Les protéines sont nommées selon la nomenclature chez la drosophile. Le complexe cohésine forme un anneau constitué de Smc1, Smc3, Rad21 et SA (Stromaline) qui encerclent les deux brins d'ADN. Nipped-B et Mau-2 sont requises pour lier le complexe au brin d'ADN. PDS5 est nécessaire à l'établissement et au maintien de la cohésion des chromatides sœurs. (Modifié de Dorsett et al. 2009)



## B. Le fuseau mitotique

Le **fuseau mitotique** est une structure bipolaire mise en place par les cellules eucaryotes en fin de G2/début de mitose, pour permettre la ségrégation des chromosomes lors de la mitose. Son rôle est donc de répartir les chromosomes dans les cellules filles lors de la division cellulaire. Il est composé de microtubules nucléés à partir de centres organisateurs des microtubules (Figure 4).

### 1. Les microtubules

Les microtubules sont des polymères protéiques composés de monomères d' $\alpha$  et  $\beta$  tubulines qui forment des tubes de 25 nm de diamètre. Les microtubules sont des structures polarisées et dynamiques. Ils possèdent une extrémité (+) qui explore le cytoplasme de la cellule, où la tubuline se fixe au microtubule sous forme de dimère d' $\alpha$  et  $\beta$  tubuline et une extrémité (-), localisée au niveau des centres nucléateurs de microtubules, où les dimères d' $\alpha$  et  $\beta$  tubuline se dissocient du microtubule (Rodionov and Borisy 1997). Ces microtubules sont des structures très dynamiques. Ainsi, l'extrémité (+) subit des épisodes de polymérisation et dépolymérisation rapides, alors que l'extrémité (-) est globalement plus stable (Mitchison and Kirschner 1984).

### 2. Le centrosome

Le centrosome est le principal centre organisateur de microtubules dans les cellules somatiques animales. La formation du fuseau mitotique requiert deux centrosomes, qui sont formés par duplication du centrosome préexistant. Chaque centrosome est composé de deux centrioles et de matériel péricentriolaire.

Chez l'humain et la drosophile, les centrioles correspondent à des structures cylindriques, constituées de neuf triplets de microtubules très stables, arrangés autour d'un cœur central. Leur duplication s'effectue au cours de l'interphase. Elle commence en phase G1 et aboutit à deux centrosomes composés chacun de deux centrioles qui restent connectés jusqu'en fin de phase G2. Lorsque la mitose commence, le matériel péricentriolaire est recruté sur les centrosomes, ce qui induit la séparation des deux

centrosomes, leur migration aux pôles de la cellule et la formation du fuseau mitotique par nucléation des microtubules (Revue : Nigg and Stearns 2011).

Autour de ces centrioles s'assemble une matrice appelée matériel péricentriolaire, qui est l'élément clé permettant la nucléation des microtubules. Le composant principal de cette matrice est le  $\gamma$ TURC ( $\gamma$ -Tubulin Ring Complex), un complexe en forme d'anneau composé de  $\gamma$ -tubuline et d'autres protéines, d'où sont nucléés les microtubules. La matrice péricentriolaire est également composée d'autres protéines ayant des rôles dans l'activation de la nucléation des microtubules ou dans l'ancrage des microtubules aux centrosomes (Revue : Woodruff, Wueseke, and Hyman 2014).

### 3. Autres centres de nucléations des microtubules

Le centrosome n'est pas le seul centre de nucléation des microtubules. Chez certains organismes comme les mammifères, la méiose se déroule sans centrosome (Dumont and Desai 2012) et il a été montré que la présence de centrosomes n'est pas indispensable pour la formation du fuseau mitotique (Khodjakov et al. 2000). En effet, les microtubules sont également nucléés à partir de la chromatine, des kinétochores et à partir d'autres microtubules (Heald et al. 1996; Kitamura et al. 2010; Petry et al. 2013; Wilde et al. 2001).

### 4. Facteurs facilitant la formation du fuseau mitotique

La formation du fuseau mitotique est facilitée par des protéines moteurs et des protéines associées aux microtubules (MAPs).

Les protéines moteurs sont les kinésines et les dynéines. Elles sont capables de se déplacer le long des microtubules en transportant d'autres protéines, et régulent également la dynamique des microtubules. Ces protéines ont des mouvements dirigés vers l'extrémité (+) ou (-) des microtubules, certaines sont bi-directionnelles. Les dynéines se dirigent de l'extrémité (+) vers l'extrémité (-).

Les MAPs sont des protéines qui se lient directement aux monomères de tubulines. Certaines d'entre elles localisent spécifiquement aux extrémités des microtubules. Ces protéines peuvent ainsi réguler la stabilité des microtubules.

Toutes ces protéines régulent de nombreux aspects de la formation du fuseau mitotique et peuvent ainsi participer à la migration des centrosomes, stabiliser les attachements kinétochores microtubules, et favoriser la congression des chromosomes (Revue : Prosser and Pelletier 2017).

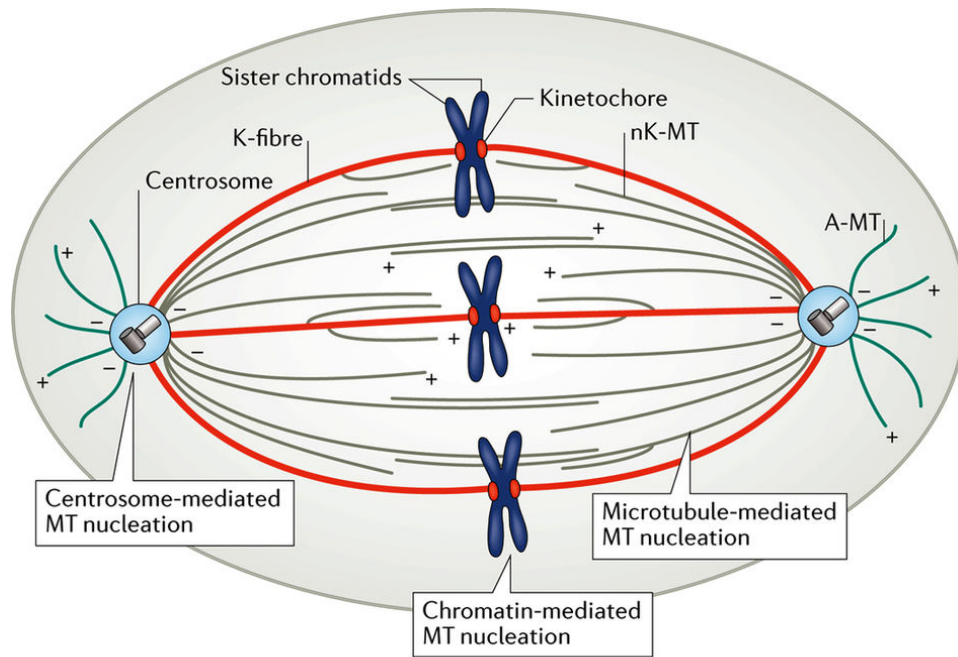
## 5. Le fuseau mitotique

Le fuseau mitotique est composé de trois types de microtubules, les microtubules kinétochoriens (ou fibres kinétochoriennes), les microtubules du fuseau (ou microtubules non-kinétochoriens) et les microtubules astraux (figure 4).

Les fibres kinétochoriennes (K-fibre) font le lien entre les kinétochores des chromosomes et les pôles du fuseau mitotique. Ces fibres sont formées par des microtubules émanants des centrosomes qui explorent le cytoplasme jusqu'à ce qu'ils capturent un kinétochore. Ce mécanisme de capture est facilité par des microtubules nucléés du kinétochore qui font le lien avec les microtubules émanants du centromère. Ce sont ces fibres, qui en dépolymérisant au moment de l'anaphase, exercent une traction sur les kinétochores et entraînent les chromosomes vers les pôles opposés de la cellule (Revue : Prosser and Pelletier 2017).

Les microtubules non-kinétochoriens (nK-MT) émanent des deux pôles du fuseau et se lient entre eux de façon antiparallèle au centre de la cellule et interagissent également avec les bras des chromosomes. Ces microtubules ont un rôle structural. Ils stabilisent le fuseau mitotique et permettent à la cellule de s'allonger au moment de l'anaphase (Revue : Prosser and Pelletier 2017).

Enfin, les microtubules astraux émanent des centrosomes vers la périphérie de la cellule. Ils permettent l'ancrage des pôles du fuseau au cortex de la cellule et participent au positionnement du fuseau mitotique. L'interaction entre les microtubules astraux et le cortex de la cellule se fait par l'intermédiaire de protéines situées à l'extrémité (+) des microtubules, telles APC (adenomatous polyposis coli), CLASPs (Cytoplasmic linker associated protein) et le complexe dynéine-dynactine, qui interagissent avec un complexe hétéromérique, composé de protéines G, PINs (Partner of Inscuteable) et Mud (Mushroom Body Defect), associé au cortex cellulaire (M. Zhu et al. 2013).



**Figure 4 : Le fuseau mitotique est un réseau bipolaire de microtubules.** Les extrémités (-) des microtubules sont localisées au niveau des pôles du fuseau, composés des centrosomes et du matériel péricentriolaire. Les extrémités (+) des microtubules polymérisent vers le cortex et vers l'équateur de la cellule. Les microtubules s'attachent aux chromosomes *via* le kinétochore. Lors de la formation du fuseau mitotique, les microtubules sont nucléés à partir des centrosomes, de la chromatine, des kinétochores et d'autres microtubules et forment trois types de microtubules : les fibres kinétochoriennes (k-fibre) qui relient les chromosomes aux pôles du fuseau mitotique, les fibres non-kinétochoriennes (nK-MT), qui se lient de façon antiparallèle entre les deux pôles du fuseau mitotique et les microtubules astraux (A-MTs), qui relient les pôles du fuseau mitotique au cortex de la cellule. (Image de Prosser and Pelletier 2017)

## C. Le kinétochore

Le kinétochore est une structure protéique assemblée au niveau du centromère de chaque chromatide sœur, composé d'environ 80 protéines qui sont séquentiellement recrutées en différents complexes. Les kinétochores ont plusieurs fonctions dans la cellule : ils permettent l'attachement des chromatides soeurs aux fibres kinétochoriennes du fuseau mitotique et possèdent un système de contrôle et de correction de cet attachement. Ils jouent aussi un rôle important dans la signalisation du point de contrôle mitotique (Spindle Assembly Checkpoint ou SAC).

## 1. Structure du kinétochore

La structure du kinétochore a été observée par microscopie électronique (Brinkley and Stubblefield 1966; Rieder 1982). Chez les vertébrés, le kinétochore est une structure d'environ 250 nm de large et 80nm de long (Haase et al. 2013). Il est composé de deux lamelles apparaissant opaques au microscope électronique. La première lamelle appelée « inner » kinétochore est juxtaposée à la chromatine centromérique, tandis que la seconde lamelle appelée « outer » kinétochore est plus distante de la chromatine et est directement liée aux microtubules (Revue : Musacchio and Desai 2017). De plus, en l'absence de microtubules attachés au kinétochore, l'outer kinétochore est recouvert d'un réseau fibreux appelé corona fibreuse (Rieder and Alexander 1990). Chez la drosophile, l'observation par microscopie électronique du kinétochore montre qu'il est également composé de deux lamelles (Maiato et al. 2006).

### a. Centromère

Le centromère est une région du chromosome sur laquelle se forme et repose le kinétochore. Chez les eucaryotes, les centromères sont constitués de séquences nucléotidiques hautement répétées appelées ADN satellite et de séquences pouvant se déplacer dans le génome appelées éléments transposables. De plus, le centromère s'étend au niveau d'une zone chromosomique qui est caractérisée par la présence d'un variant de l'histone H3 appelé Cid (Centromere Identifier) chez la drosophile ou CENP-A (Centromeric Protein A) chez l'humain (Henikoff et al. 2000; Earnshaw and Rothfield 1985; Malik and Henikoff 2001). L'histone H3 canonique est cependant également présente au niveau des nucléosomes de l'ADN centromérique. D'autres protéines sont enrichies au niveau de ces régions centromériques tel que le complexe CPC (Chromosomal Passenger Complex) dont le rôle sera décrit ci-après (voir section "III. Aurora B et le Chromosomal Passenger Complex" p47) (Vader et al. 2006). Enfin, plus récemment, des molécules d'ARN non codants ont été localisées au niveau du centromère. Chez la drosophile, ces molécules d'ARN appelées SAT III RNA sont transcrites à partir de séquences satellites localisées au niveau du centromère du chromosome X (SAT III). SAT III RNA localise sur les centromères de tous les

chromosomes et est nécessaire à la localisation correcte de CID (variant d'H3 centromérique) et de la protéine CENP-C (protéine de l'inner kinetochoire) (Rošić, Köhler, and Erhardt 2014).

### b. Inner kinétochoire

Ce complexe est impliqué dans le recrutement des protéines de l'outer kinétochoire (qui sera décrit plus bas) et participe donc indirectement à la congression des chromosomes. Ce complexe pourrait aussi aider au recrutement de CENP-A au centromère (Revue : Musacchio and Desai 2017).

Chez les vertébrés, l'inner kinetochoire correspond à un complexe multiprotéique appelé CCAN (Constitutive Centromere Associated Network), composé d'une quinzaine de protéines appelées CENPs (CENTromeric Proteins) (Foltz et al. 2006; Hori et al. 2008; Amano et al. 2009; Revue : Cheeseman and Desai 2008). Chez la drosophile, ce complexe multiprotéique n'existe pas. Seule CENP-C est présente et fait le lien entre CENP-A et l'outer kinétochoire (Revue : Drinnenberg, Henikoff, and Malik 2016).

Contrairement à l'outer kinétochoire, ce complexe est localisé sur les centromères tout le long du cycle cellulaire.

### c. Outer kinétochoire

L'outer kinetochoire est la plateforme d'ancrage des extrémités (+) des fibres kinétochoriennes. Il transmet aux chromatides la force générée par les microtubules en dépolymérisation, ce qui permet leur mouvement vers les pôles de la cellule au cours de l'anaphase. Ce complexe est formé au cours de la prophase et se dissocie en fin de mitose.

La base de l'outer kinétochoire correspond à un complexe appelé KMN (Knl1, Mis12, Ndc80) lui-même divisé en 3 sous-complexes ayant chacun une fonction différente (figure 5).

#### **-complexe mis12**

Le complexe Mis12 est composé de quatre sous-unités, conservées de la levure à l'homme : Dsn1, Nsl1, Mis12 et Pmf1. Ce complexe promeut l'assemblage du complexe

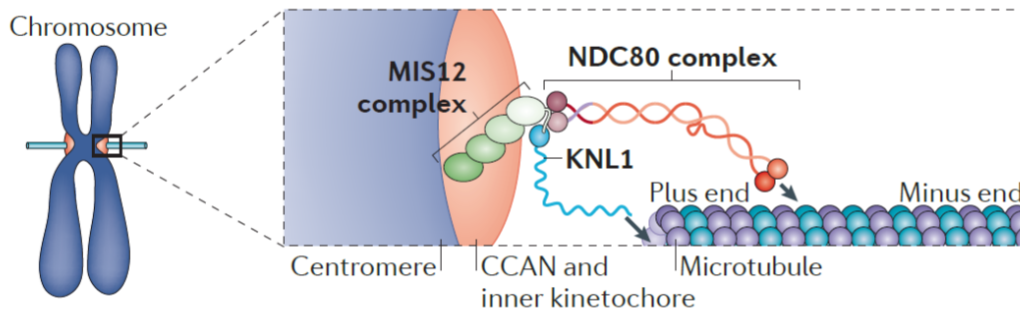
KMN et fait le lien entre l'inner kinétochore, plus précisément entre CENP-C, et le complexe Ndc80 et la protéine Knl1 de l'outer kinetochore (Cheeseman et al. 2004; Kline et al. 2006).

### **-complexe ndc80**

Le complexe Ndc80 est le principal récepteur des microtubules du kinétochore. Il est composé de 4 sous-unités : Spc24, Spc25, Ndc80 et Nuf2 formant des super-hélices (« coiled-coil ») permettant la création d'un long axe d'environ 60 nm (Wigge and Kilmartin 2001). Les domaines C-terminaux des sous-unités Spc24 et Spc25 sont responsables de l'attachement du complexe avec le kinétochore. A l'opposé du complexe, les domaines N-terminaux des sous-unités Ndc80 (Hec1 chez l'humain) et Nuf2 permettent de faire le lien avec les microtubules par interaction directe de Ndc80 avec les monomères d' $\alpha$  et  $\beta$  tubulines des microtubules (McClelland et al. 2003; Wei, Sorger, and Harrison 2005).

### **-sous-unité KNL1**

La sous-unité Knl1 possède en C-terminal un domaine appelé RWD (RING-WD40-DEAD), qui interagit avec la sous-unité Nls1 du complexe Mis12 (Petrovic et al. 2014). En N-terminal, cette protéine est peu structurée mais cette partie protéique contient des sites de fixation pour la phosphatase PP1, ainsi que des répétitions MELT (Met-Glu-Leu-Thr) nécessaires au recrutement de protéines régulatrices du SAC (Revue : Cheeseman et al. 2008; Revue : Musacchio 2015).



**Figure 5 : Schéma représentant le complexe KMN.** Le complexe Mis12 fait le lien entre le CCAN au niveau de l'inner kinétochore et le reste du complexe KMN : NDC80 et KNL1. NDC80 permet l'attachement des kinétochores aux microtubules. KNL1 est impliquée dans le recrutement des protéines du SAC (Image de Foley & Kapoor 2012)

#### d. Corona fibreuse

Autour du complexe KMN s'organisent d'autres protéines dans une zone appelée corona fibreuse. Cette zone contient les protéines régulatrices du SAC comme BubR1, Bub3, MAD1, MAD2 (voir section "i. Composants du SAC" p22), le complexe RZZ (Rod-Zwilch-ZW10) (voir section "iiii. Inactivation du SAC" p26), et des protéines modulant l'attachement des microtubules, comme CENP-E. La plupart de ces protéines disparaissent lorsque les microtubules sont fixés correctement au niveau des kinétochores. En effet, par microscopie électronique, l'apparition de microtubules au niveau des kinétochores a pu être corrélée avec la disparition de la partie fibreuse positionnée sur l'outer kinétochore (Rattner and Bazett-Jones 1989).

## 2. Fonctions du kinétochore

### a. Interaction kinétochore-microtubules

Afin de diviser le matériel génétique de manière égale pendant l'anaphase, chacun des deux kinétochores d'une paire de chromatides sœurs doit être attaché à un pôle différent du fuseau mitotique (attachement amphitélique, figure 6 a). Au début de la mitose, aucun chromosome n'est attaché au fuseau mitotique. Les fibres



kinétochoriennes, dynamiques, explorent le cytoplasme de la cellule jusqu'à ce qu'elles capturent un kinétochore. C'est ce qu'on appelle le mécanisme de recherche et capture.

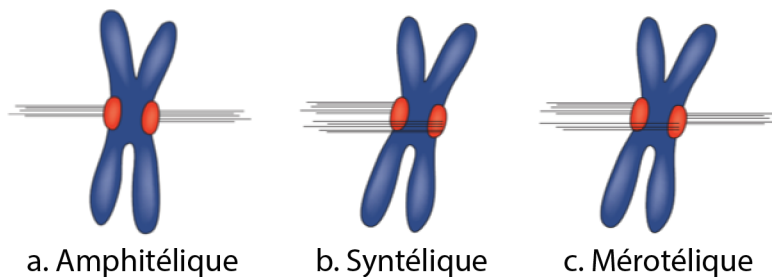
L'interaction initiale entre kinétochore et microtubules a lieu généralement le long du microtubule, via l'attachement avec la kinésine Kar3 localisée au kinétochore (Tanaka et al. 2005). Cet attachement transitoire est ensuite remplacé par une interaction stable entre l'extrémité (+) des microtubules et le complexe NDC80 (Tanaka et al. 2007). En effet, le complexe NDC80 se lie et maintient des interactions persistantes avec les microtubules. Premièrement, des interactions électrostatiques se créent entre les sous-unités NDC80 et Nuf2, et les monomères de tubuline. Deuxièmement, le complexe NDC80 se lie aux microtubules grâce à la sous-unité NDC80 qui s'intercale entre les monomères de tubulines. Ces interactions permettent au complexe NDC80 de lier des microtubules tous les 4 nm et de maintenir une interaction persistante même lors de la dépolymérisation des microtubules, car le complexe NDC80 a la capacité de "glisser" le long des microtubules malgré leur dépolymérisation (Alushin et al. 2012; Revue : Foley and Kapoor 2012).

D'autres acteurs contribuent à la liaison kinétochore/microtubules. Le complexe SKA (Spindle and Kinetochore-Associated) interagit avec les microtubules dynamiques ainsi qu'avec NDC80, et favorise ainsi les attachements kinétochore-microtubules (Hanisch, Silljé, and Nigg 2006; Gaitanos et al. 2009). D'autres protéines régulent ces attachements kinétochore-microtubules telles Kif18a, ch-TOG/XMAP215, MCAK, CENPE ou encore la dynéine, ainsi que Polo et BubR1 (voir section "4. Fonctions aux centromères/kinétochores" p36 et section "b. Le rôle de BubR1 dans l'attachement kinétochore-microtubules" p44).

## b. Correction de l'attachement kinétochore-microtubules

Le mécanisme de recherche et capture entraîne parfois des erreurs d'attachement. Les deux kinétochores des chromatides sœurs peuvent être attachés tous les deux au même pôle du fuseau mitotique (attachement syntélique, figure 6 b), ou encore l'un des kinétochores peut être attaché simultanément aux deux pôles opposés du fuseau mitotique (attachement mérotélique, figure 6 c) (Revue : O'Connell and Khodjakov 2007). Pour permettre à la cellule de passer en anaphase, tous les attachements syntéliques et

mérotéliques doivent être éliminés, alors qu'à l'inverse, les attachements amphitéliques doivent être stabilisés. Ces deux événements opposés sont régulés par des réactions de phosphorylation et déphosphorylation, essentiellement effectuées par la kinase Aurora B et les phosphatases PP1 et PP2A, accompagnée de sa sous-unité B56 (Lampson et al. 2004; Dan Liu et al. 2010; Foley, Maldonado, and Kapoor 2011).



**Figure 6 : Les différentes configurations d'attachement possibles des kinétochores aux microtubules.** (a) Attachement amphitélique : chacun des deux kinétochores est attaché à un pôle différent du fuseau mitotique. (b) Attachement syntélique : les deux kinétochores sont attachés au même pôle du fuseau mitotique. (c) Attachement mérotélique : un kinétochore est attaché aux deux pôles du fuseau mitotique. (Modifié de Prosser and Pelletier 2017)

Aurora B peut déstabiliser et éliminer les erreurs d'attachement entre kinétochores et microtubules. Cette fonction passe par la phosphorylation de substrats au niveau de l'outer kinetochore (Lampson et al. 2004). En effet, des protéines du complexe KMN sont phosphorylées par Aurora B, ce qui diminue leur affinité pour les microtubules et par conséquent déstabilise l'attachement kinétochore-microtubules. A l'inverse, les phosphatase PP1 et PP2A localisées au kinétochore, déphosphorylent en parallèle les cibles d'Aurora B afin de stabiliser les attachements kinétochore-microtubules (Dan Liu et al. 2010; Foley, Maldonado, and Kapoor 2011).

Ce mécanisme de régulation est dépendant de la tension au niveau du kinétochore. La formation d'attachements amphitéliques entraîne une augmentation de la tension appliquée au niveau des kinétochores, puisque les deux kinétochores des chromatides sœurs sont tirés vers les pôles opposés de la cellule par le fuseau mitotique alors que la cohésine maintient les centromères liés. Cette tension générée augmente donc la distance entre le centromère et le kinétochore. Ainsi, Aurora B, située au centromère, est éloignée de ses substrats situés au niveau de l'outer kinétochore (Lampson and Cheeseman 2011). Par conséquent, l'activité des phosphatases PP1 et PP2A-B56 situées au niveau de l'outer

kinetochore entraîne une déphosphorylation des substrats de Aurora B, ce qui aura pour effet de stabiliser les attachements kinétochore-microtubules.

Le complexe SKA est également phosphorylé par Aurora B ce qui inhibe son interaction avec NDC80 (Y. W. Chan et al. 2012).

### c. Point de contrôle du fuseau mitotique (SAC)

Pour préserver la stabilité du génome lors des divisions cellulaires, chaque chromosome doit être attaché de manière amphitélique au fuseau bipolaire afin que la ségrégation du matériel génétique se fasse correctement. Le SAC est un mécanisme de surveillance qui bloque la cellule en prométaphase tant que tous les chromosomes ne sont pas correctement attachés aux microtubules (Clute and Pines 1999). La fonction du SAC est d'empêcher la perte de cohésion des chromatides sœurs et d'éviter une ségrégation prématurée des chromosomes en présence de chromosomes non attachés ou incorrectement attachés au fuseau mitotique. Le dysfonctionnement du SAC induit la formation de cellules aneuploïdes et est impliqué dans la tumorigénèse (M. Li et al. 2009).

#### *i. Composants du SAC*

L'existence de ce mécanisme a tout d'abord été suspectée dans les années 50-60. L'apparition de la vidéomicroscopie et des expériences de micromanipulation des chromosomes, ont permis d'observer que l'anaphase ne démarrait pas tant que les kinétochores n'étaient pas alignés sur la plaque métaphasique (Bajer and Molè-Bajer 1955; Nicklas 1967). Dans les années 90, deux cribles ont été entrepris en parallèle chez *Saccharomyces cerevisiae* et *Schizosaccharomyces pombe* afin d'identifier des mutants de levure n'ayant plus la capacité d'arrêter leur cycle cellulaire en présence de poison des microtubules. Ces cribles ont permis de découvrir de nombreux gènes impliqués dans le SAC qui ont été nommés *mad* (Mitotic Arrest Deficient) et *bub* (budding uninhibited by benomyl) respectivement (R. Li and Murray 1991; Hoyt, Totis, and Roberts 1991). Ces études ont donc mis en évidence l'existence de gènes impliqués dans un mécanisme de surveillance qui régule la transition entre métaphase et anaphase. Il a ensuite été démontré que ce mécanisme était conservé chez tous les eucaryotes (Revue : Elledge

1996). L'activité du SAC est essentielle au développement des vertébrés. En revanche, le SAC n'est pas indispensable au développement et à la survie de la drosophile (Buffin, Emre, and Karess 2007).

Les acteurs principaux du SAC sont les Sérine/Thréonine kinases MPS1 (Monopolar Spindle 1), Bub1 (Budding Uninhibited by Benomyl 1), BubR1 (Bub1-Related 1) et les protéines MAD1, MAD2 (Mitotic Arrest Deficient 1 et 2) et Bub3.

## *ii. Mise en place du SAC*

Ces protéines du SAC sont recrutées au niveau des kinétochores non attachés afin de générer un signal qui inhibe l'activité de l'APC/C et donc empêche la dégradation de la sécurine et de la cyclineB. Par conséquent, la cohésine entre les chromatides sœurs est préservée ainsi que l'activité CDK1 respectivement.

La mise en place du SAC commence par le recrutement de la protéine kinase MPS1 au kinétochore. Le recrutement de MPS1 sur les kinétochores non attachés est induit par la phosphorylation du domaine N-terminal de NDC80 par la kinase Aurora B (Santaguida et al. 2010; T. Zhu et al. 2013). La kinase MPS1 participe ensuite au recrutement de toutes les autres protéines du SAC (Lan and Cleveland 2010). MPS1 phosphoryle KNL1 sur des séquences spécifiques appelées MELT (Met-[Glu/Asp]-[Leu/Ile/Val/Met]-Thr). Ces motifs phosphorylés sont reconnus par Bub1 et Bub3, et permettent leur recrutement sur le kinétochore et celui de BubR1 qui interagit directement avec Bub3 (Primorac et al. 2013). MPS1 promeut également le recrutement de MAD1/MAD2 sur le kinétochore en phosphorylant Bub1. En effet, la forme phosphorylée de Bub1 interagit directement avec l'hétérodimère MAD1/MAD2 (London and Biggins 2014; Yamagishi et al. 2012,).

Le complexe RZZ (Rod-zwilch-ZW10, uniquement présent chez les métazoaires), interagit également avec MAD1/MAD2 pour stabiliser leur recrutement sur le kinétochore (Williams et al. 2003; Starr et al. 1998; Revue : Karess 2005).

Une fois recrutés sur le kinétochore, les hétérodimères de MAD1/MAD2 catalysent un changement de conformation d'un pool cytosolique de MAD2 pour le faire passer de sa forme dite ouverte (O-MAD2 : Open-MAD2) à sa forme dite fermée (C-MAD2 : Closed-MAD2) (Mapelli et al. 2007; De Antoni et al. 2005). Le passage de la protéine en conformation C-MAD2 augmente son affinité pour CDC20, le co-facteur de l'APC/C. C-MAD2/CDC20 forment un complexe qui interagit ensuite avec BubR1 et Bub3 pour

former le MCC (Mitotic Checkpoint Complex). BubR1 et MAD2 ont la capacité d'interagir directement avec CDC20, ce qui n'est pas le cas de Bub3 qui n'interagit directement qu'avec BubR1 (Faesen et al. 2017). Le MCC diffuse ensuite dans le cytoplasme de la cellule afin d'inhiber globalement l'activité de l'APC/C (figure 7).

### *iii. Inhibition de l'APC/C*

Le principal inhibiteur de l'APC/C est le MCC. En effet, la formation du complexe MCC séquestre une large fraction de CDC20, réduisant donc la quantité de CDC20 disponible pour l'activation de l'APC/C. De plus, il a été montré récemment que le MCC agit comme un inhibiteur direct de l'APC/C. Il se lie via BubR1 à une seconde molécule de CDC20 déjà incluse dans un complexe actif APC/C<sup>CDC20</sup> et inactive l'APC/C en jouant le rôle de pseudosubstrat. Plus précisément, ce sont les KEN box et la D-box de BubR1 qui sont reconnues par l'APC/C<sup>CDC20</sup> et qui entrent en compétition avec les substrats de l'APC/C<sup>CDC20</sup> (Tian et al. 2012; J. L. Burton and Solomon 2007) (figure 7).

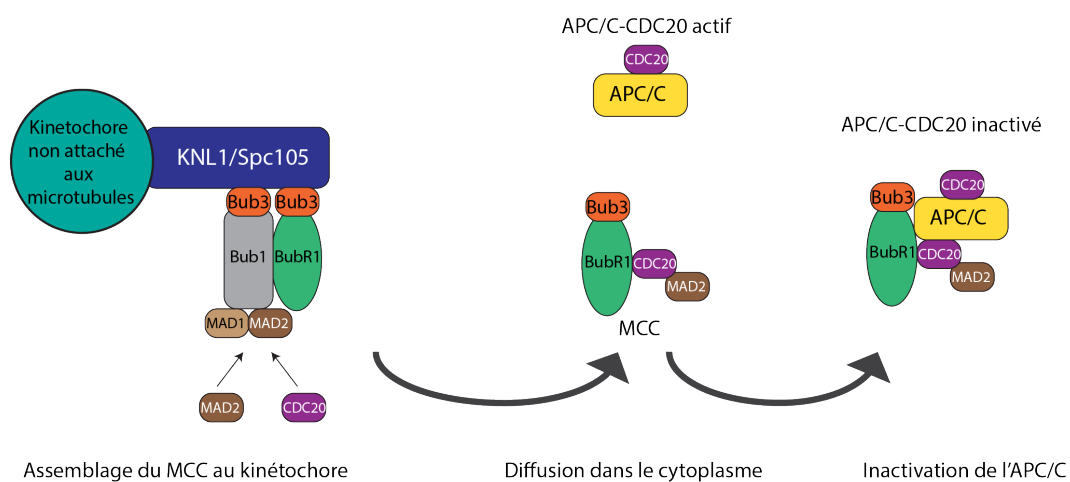
Il existe également un sous-complexe du MCC capable d'inhiber l'APC/C, le complexe BBC (BubR1-Bub3-CDC20). Ce complexe est retrouvé lié à l'APC/C dans plusieurs études et il a été montré qu'il était suffisant pour inhiber l'APC/C, néanmoins avec une efficacité moindre que le MCC. Le BBC est généré par l'extraction de MAD2 et de l'une des deux molécules de CDC20, d'un complexe APC/C<sup>CDC20</sup>/MCC. (Kulukian, Han, and Cleveland 2009; Han et al. 2013).

CDC20 est également un substrat de l'APC/C. C'est l'interaction de BubR1/Bub3 avec une molécule de CDC20 qui permet à l'APC/C<sup>CDC20</sup> de reconnaître CDC20 comme un substrat. CDC20 est ensuite ubiquitiné pour induire sa dégradation par le protéasome, réduisant la quantité de CDC20 disponible pour l'activation de l'APC/C (Nilsson et al. 2008).

Des expériences de destruction d'un ou plusieurs kinétochores par laser ablation ont suggéré que la présence d'un seul kinétochore non attaché était suffisante pour activer le SAC et empêcher la progression de la mitose (Rieder et al. 1995). Cependant, de récentes études ont révélées que la réponse du SAC n'est pas de type « tout ou rien »: elle est proportionnelle au nombre de kinétochores incorrectement attachés au fuseau mitotique (Collin et al. 2013; Dick and Gerlich 2013; Heinrich et al. 2013). Plus le nombre

de kinétochores incorrectement attachés est important, plus la vitesse de génération du MCC est élevée (Dick and Gerlich 2013).

Des études *in vitro* et *in vivo* ont montré que l'APC/C est phosphorylée par CDK1 et PLK1 (S. Zhang et al. 2016; Golan, Yudkovsky, and Hershko 2002). CDK1 et PLK1 sont activées dès l'entrée en mitose, alors que les protéines du SAC ne sont recrutées sur le kinétochoire qu'après activation de CDK1 et PLK1 en prophase et ne peuvent donc pas inhiber l'APC/C avant cette étape. L'APC/C doit donc être inhibé en début de mitose, *via* un autre mécanisme que le SAC, afin de protéger la sécurine et la cycline B d'une dégradation précoce. Il a été montré chez l'humain qu'une faible quantité de MCC est présente durant l'interphase et permettait d'inhiber l'APC/C. Ce MCC est produit en interphase par MAD1/MAD2 au niveau des pores nucléaires (Rodriguez-Bravo et al. 2014). L'activité de l'APC/C est également inhibée lors des premiers stades de la mitose par une protéine appelée EMI1 (Early Mitotic Inhibitor 1) qui se fixe sur le complexe APC/C<sup>CDC20</sup> et empêche le recrutement des substrats de l'APC/C (Reimann et al. 2001).



**Figure 7 : Schéma simplifié de la mise en place du SAC et de l'inhibition de l'APC/C .** Lorsqu'un kinétochoire n'est pas attaché, Bub1/Bub3 et BubR1/Bub3 sont recrutés sur le kinétochoire via KNL1/SPC105. Bub1 recrute à son tour le dimère MAD1/MAD2. Ce dimère catalyse le changement de conformation de MAD2, qui va interagir avec CDC20. MAD2 et CDC20 interagissent ensuite avec BubR1/Bub3 pour former le MCC. Le MCC diffuse dans le cytoplasme et inhibe l'APC/C<sup>CDC20</sup>.

#### *iiii. Inactivation du SAC*

Lorsque les kinétochores sont attachés de manière amphitélique aux microtubules, le SAC doit être inactivé pour permettre le passage de la cellule en anaphase.

##### **-Activation des phosphatases**

Le premier mécanisme permettant la dissociation des protéines du SAC du kinétochore requiert l'action des phosphatases PP1 et PP2A. Ces deux phosphatases sont recrutées au kinétochore par KNL1.

PP2A est recrutée indirectement sur KNL1 par BubR1, alors que PP1 interagit directement avec deux motifs présents sur KNL1. Cette interaction est régulée par Aurora B, qui phosphoryle ces deux motifs et empêche l'interaction entre PP1 et KNL1. Lorsque les kinétochores sont sous tension, la distance entre centromères et outer kinétochore augmente. Aurora B, située au centromère, est éloignée de ses substrats de l'outer kinétochore et ne peut plus les phosphoryler (Revue : Lampson and Cheeseman 2011). Les motifs permettant le recrutement de PP1 sur KNL1 sont déphosphorylés par PP2A, entraînant le recrutement de PP1 au kinétochore.

Les deux phosphatases déphosphorylent les sites MELT de KNL1, ce qui abolit l'interaction de KNL1 avec Bub1, Bub3 et BubR1 (Espert et al. 2014, 56; Nijenhuis et al. 2014).

##### **-Déplacement de l'hétérodimère Mad1-Mad2**

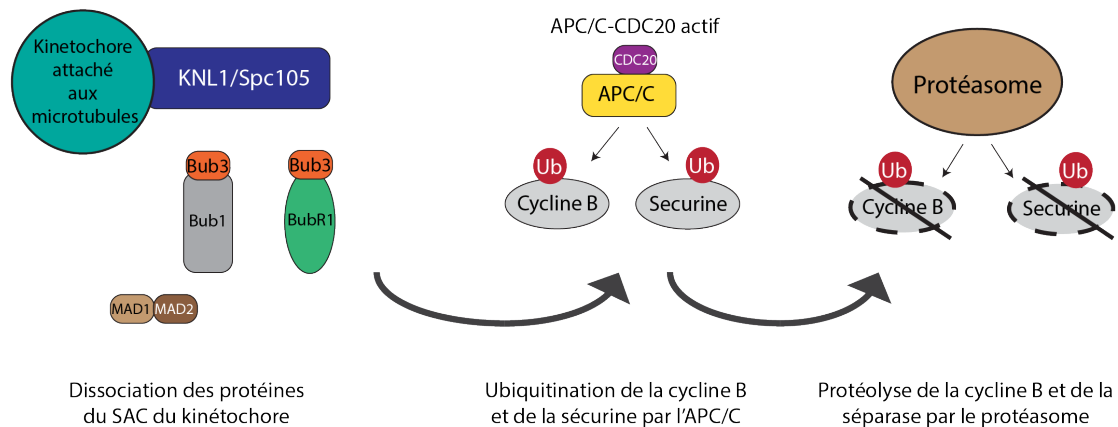
Un second mécanisme d'inactivation du SAC passe par le déplacement de l'hétérodimère MAD1/MAD2 du kinétochore vers les pôles de la cellule par le complexe dynéine/dynactine. Ce processus requiert le complexe RZZ qui interagit avec MAD1/MAD2 et qui recrute la dynéine/dynactine au kinétochore *via* la protéine adaptatrice Spindly (Gassmann et al. 2010). Lorsque les microtubules se fixent sur les kinétochores, le complexe dynéine/dynactine migre sur les microtubules vers les pôles de la cellule, entraînant le complexe RZZ ainsi que MAD1/MAD2 (B. J. Howell et al. 2001). La délocalisation de MAD1/MAD2 du kinétochore a pour effet l'arrêt de la formation du MCC et donc l'inactivation du SAC (Basto et al. 2004)

### -Inhibiteurs moléculaires

D'autres protéines participent à l'inactivation du SAC. P31 comet et son partenaire TRIP13 sont impliqués dans la conversion de la forme active de MAD2 (C-MAD2) en la forme inactive (O-MAD2), ce qui a pour effet de diminuer la quantité et la production de MCC (Ma and Poon 2016).

### -Ubiquitination et dégradation

Des ubiquitine ligases, dont l'APC/C, participent également à l'extinction du SAC en ubiquitinant CDC20 et BubR1, ce qui a pour effet de déstabiliser le MCC (Revue : Lara-Gonzalez, Westhorpe, and Taylor 2012)



**Figure 8 : Schéma simplifié de l'extinction du SAC et de la dégradation de la cycline B et de la séparase.** Lorsque les kinétochores sont correctement attachés aux microtubules, les complexes Bub1/Bub3, BubR1/Bub3 et MAD1/MAD2 sont dissociés du kinétochore. La cycline B et la séparase sont ubiquitinées par l'APC/C<sup>CDC20</sup> puis dégradées par le protéasome.





# Chapitre 2 : Les régulateurs mitotiques

## I. La famille des Polo-like kinases (Plks)

La protéine Polo est une sérine/thréonine kinase découverte en 1988 par un crible génétique chez la drosophile dans le but d'identifier de nouveaux gènes impliqués dans la régulation de la mitose (Sunkel and Glover 1988). Il a été observé que la mutation du gène Polo provoquait de nombreux défauts aux pôles du fuseau mitotique chez les embryons de drosophiles, d'où le nom de Polo (pôle en espagnol). Les homologues de Polo ont été retrouvés dans différentes espèces et s'appellent Polo-like Kinase 1 (PLK1) chez l'humain (Golstein et al. 1995), Plx1 chez le Xénope (Descombes and Nigg 1998) ou encore Cell Division Cycle 5 (Cdc5) chez *Saccharomyces cerevisiae* (Kitada et al. 1993). Dans ce chapitre, nous utiliserons la dénomination Polo pour désigner cette protéine quelque soit l'espèce pour simplification.

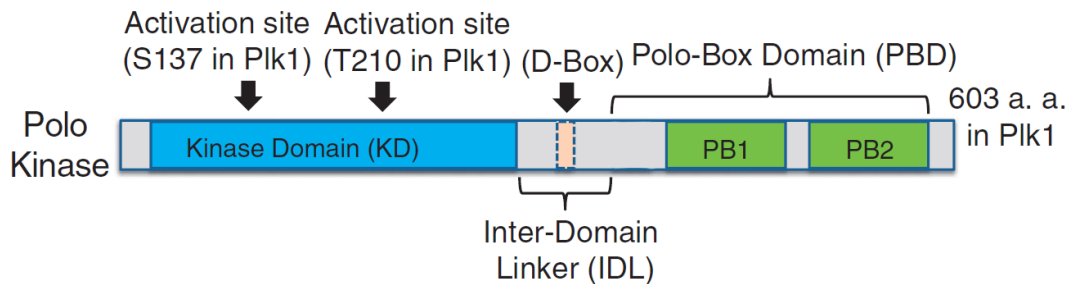
### A. Structure

La structure de Polo est hautement conservée entre les espèces. Elle est constituée d'un domaine Sérine/Thréonine kinase en position N-terminale suivi d'un domaine appelé Polo Box Domain (PBD) en position C-terminale. Ces deux domaines sont séparés par une séquence protéique appelée Inter-Domain Linker (IDL), contenant une Destruction-Box (D-Box) (Revue : Archambault, Lépine, and Kachaner 2015) (figure 9).

Le domaine kinase contient une boucle d'activation (T-loop) incluant un résidu thréonine phosphorylable (Thr182 chez la drosophile, Thr210 chez l'humain). La phosphorylation de cette thréonine est nécessaire à l'activation de Polo (Carmena et al. 2012a; Jang et al. 2002).

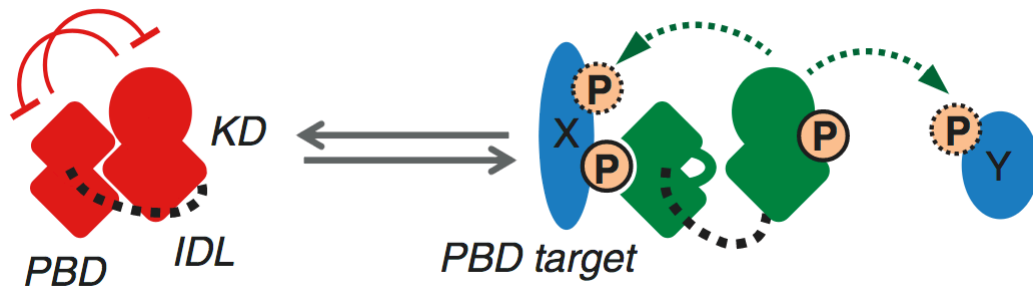
Le PBD contient deux Polo-box (PB), nommées PB1 et PB2, constituées chacune de 6 feuillets  $\beta$  antiparallèles et d'une hélice alpha. La PB1 est précédée d'une hélice  $\alpha$  qui a pour rôle de stabiliser le repliement des PB (Cheng et al. 2003). Les deux PB forment un module hétérodimérique permettant à Polo de reconnaître ses partenaires. Chez

l'humain, les résidus Trp414 et Leu490 de la PB1 reconnaissent les partenaires de Polo par des interactions hydrophobes. Les résidus His538 et Lys540 de la PB2 reconnaissent un motif spécifique de type Ser-phosphoThr/phosphoSer-Pro/X dans les partenaires de Polo et interagissent directement avec ces groupements phosphates chargés négativement (Elia et al. 2003).



**Figure 9 : Les différents domaines de Polo.** En N-terminal se trouve le domaine kinase et en C-terminal le domaine Polo-Box. Les deux principaux sites d'activation dans le domaine kinase sont indiqués. Le domaine Polo-Box contient deux Polo Box. Le domaine kinase et le domaine Polo-Box sont séparés par l'Inter-Domain Linker, qui contient une D-Box. (Image de Archambault et al. 2015)

La conformation tridimensionnelle de Polo entraîne un antagonisme entre le PBD et le domaine kinase. En effet, le PBD rend le domaine kinase moins flexible et par conséquent moins actif. Réciproquement, le domaine kinase stabilise une conformation du PBD qui est moins apte à interagir avec des cibles phosphorylées. C'est l'attachement à un substrat ou la phosphorylation de la T-loop du domaine kinase qui élimine cette inhibition intramoléculaire (Revue : Archambault, Lépine, and Kachaner 2015; Elia et al. 2003) (figure 10).



**Figure 10 : Mécanisme basique de l'activité de Polo.** A gauche : le PBD et le domaine kinase s'inhibent mutuellement *via* des interactions intramoléculaires. La phosphorylation de la T-loop supprime l'interaction intramoléculaire inhibitrice et active le domaine kinase. A droite, le PBD se lie à sa cible (X) préalablement phosphorylée sur un motif spécifique. Le domaine kinase peut ensuite phosphoryler la même cible sur un site différent, ou phosphoryler une autre cible (Y) dans l'environnement local. (Image de Archambault et al. 2015)

## B. Activation de Polo

L'activation de Polo est effectuée principalement par phosphorylation de la T-loop *via* l'activité des kinases Aurora A et Aurora B (Revue : Vincent Archambault and Carmena 2012).

Chez les mammifères, l'activation primaire de Polo est effectuée aux centrosomes par la kinase Aurora A et son co-facteur Bora. Bora est une protéine exprimée en G2 qui interagit avec le domaine kinase et le PBD de Polo. L'interaction entre Polo et Bora modifie la conformation de Polo, rendant la Thr210 de la T-loop du domaine kinase de Polo accessible pour être phosphorylée par Aurora A (Seki et al. 2008) (figure 9). Chez la drosophile, Bora n'interagit pas avec Polo et la suppression de Aurora A ne diminue que faiblement l'activité de Polo (Carmena et al. 2012). Il est donc possible que seul Aurora B active Polo chez la drosophile.

La kinase Aurora B fait partie d'un complexe de 4 protéines (Aurora B, Survivine, Boréoline et INCENP) appelé CPC (voir section "III. Aurora B et le Chromosomal Passenger Complex" p47). Il a été montré chez l'humain et chez la Drosophile, que Polo est phosphorylée au niveau de la T-loop (Thr182 chez la drosophile, Thr210 chez l'humain) et activée en début de mitose au centromère par Aurora B. Ce processus est facilité par l'interaction entre Polo et INCENP au niveau du centromère (Carmena et al. 2012).

D'autres sites de phosphorylation contribuant à l'activation de Polo ont été identifiés. Chez l'humain, la sérine 137 (Ser137) de Polo, située dans la région charnière du domaine kinase, est également phosphorylée en fin de mitose (Jang et al. 2002; van de Weerd et al. 2005). La phosphorylation de cette sérine est effectuée par une kinase de la même famille que Polo, qui est PLK2 (Matsumoto et al. 2009). Cette phosphorylation n'est pas nécessaire à l'activation de Polo, mais a pour effet d'augmenter son activité kinase (Jang et al. 2002) (figure 9).

## C. Localisation de Polo au cours du cycle cellulaire

Il existe deux modes de régulation du recrutement de Polo. Le mode de régulation le plus commun (« non-self priming ») implique la phosphorylation par CDK1 d'un motif pSer/pThr-Pro présent sur un partenaire de Polo. Une fois phosphorylé, le motif est reconnu par le PBD, ce qui permet à Polo d'être recruté par son partenaire. Le second mode d'attachement est moins fréquent. Polo phosphoryle directement son partenaire pour générer son propre site d'attachement (« self-priming »). Ce mode d'attachement permet l'auto-amplification du recrutement de Polo sur son partenaire (K. S. Lee, Park, et al. 2008).

Chez la drosophile, Polo est localisée pendant tout le cycle cellulaire sur les centrosomes et sur les microtubules. Lorsque la cellule entre en mitose, Polo s'enrichit sur les centrosomes, et s'accumule au niveau de l'enveloppe nucléaire et sur les kinétochores. En prométaphase, lors de la fragmentation de l'enveloppe nucléaire, Polo est localisé sur les microtubules du fuseau mitotique et sur les kinétochores. Pendant l'anaphase, Polo quitte les kinétochores et se localise au niveau de l'équateur sur les microtubules du fuseau central pour finalement s'associer au midbody pendant la télophase (Moutinho-Santos et al. 1999). La dynamique de Polo chez les mammifères est similaire, excepté que Polo ne se localise pas sur les microtubules et centrosomes en interphase, et localise sur les centromères en phase G1 (McKinley and Cheeseman 2014).

## 1. Recrutement au centrosome

Il a été montré chez la drosophile que Polo est recruté au centrosome par la protéine SAS4 pendant la mitose, *via* un site d'attachement généré par CDK1 (Novak et al. 2016).

## 2. Recrutement au kinétochore

De nombreuses protéines participent au recrutement de Polo aux kinétochores.

Chez l'humain, Polo est recruté par self-priming au kinétochore par l'un des composant du CCAN de l'inner kinetochore, PIBP1 (Polo-box interacting Protein 1 également appelée CENP-U). Polo génère son propre site d'attachement sur PIBP1, par phosphorylation de sa Thr78 (Kang et al. 2006). L'interaction entre PBIP1 et Polo a lieu en début de G2 alors que Polo n'est pas pleinement active. Il est possible que Polo se lie avec PBIP1 avec une faible affinité, phosphoryle PBIP1<sup>T78</sup> grâce à son activité basale, ce qui amplifie le recrutement de Polo sur PBIP1 (K. S. Lee, Oh, et al. 2008). PIBP1 est ensuite dégradée en mitose précoce, de manière Polo-dépendante et d'autres protéines prennent le relais pour recruter Polo au kinétochore.

Chez l'humain, Polo est également recrutée au kinétochore, de manière CDK1 dépendante et *via* le PBD, par des protéines associées au centromère ou au kinétochore telles que INCENP, Bub1, BubR1, NUDC, CLIP170 et CLASP2 (Goto et al. 2006; Ikeda and Tanaka 2017; Elowe et al. 2007; Nishino et al. 2006; Amin et al. 2014, 170; Maia et al. 2012).

Une autre étude réalisée à la fois chez l'humain et chez le nématode montre que Polo est recruté au kinétochore en prométaphase par la sous-unité CAPG2 du complexe condensine II (J. H. Kim et al. 2014).

A ce jour, aucune étude ne montre comment Polo est recruté au kinétochore chez la drosophile. Il n'existe pas d'homologues de PIBP1 ou de CAPG2 connus chez la drosophile, mais les orthologues de INCENP, Bub1, BubR1, NUDC, CLIP190, CLASP2 (pour CLIP170) existent. Ces protéines pourraient jouer le même rôle dans le recrutement de Polo au kinétochore chez la drosophile.

### 3. Recrutement sur les microtubules

Chez la drosophile, Polo est recruté sur le fuseau mitotique en cytokinèse et en interphase par une protéine associée aux microtubules, MAP205 (Microtubule Associated Protein 205). Cette interaction est singulière car elle a pour effet d'inhiber l'activité de Polo et ne requiert pas la phosphorylation de MAP205. Au contraire, la phosphorylation de MAP205 par CDK1 inhibe l'interaction entre MAP205 et Polo et provoque la dissociation de Polo des microtubules (V. Archambault et al. 2008).

En anaphase, chez l'humain et la *Drosophila*, Polo est relocalisée des kinétochores vers le fuseau central *via* la protéine FEO (Fascetto) chez la drosophile, appelée PRC1 (Protein Regulator Of Cytokinesis 1) chez l'humain. Cette interaction entre Polo et PRC1 est régulée par Polo et CDK1. Polo phosphoryle PRC1 pour générer son propre site d'attachement alors que CDK1 phosphoryle PRC1 pour inhiber l'interaction entre Polo et PRC1 (Neef et al. 2007).

Chez l'humain, le self-priming de Polo en anaphase sur les kinésines MKLP1 et MKLP2 (Pavarotti et subito respectivement chez la drosophile) facilite son recrutement au niveau du fuseau central. (Neef et al. 2003; Adams et al. 1998; Cesario et al. 2006).

D'autres protéines régulatrices de la cytokinèse interagissent directement avec les PBD et participent au recrutement de Polo sur le fuseau central, comme NUDC, ROCK2 et ECT2 (J. Li et al. 2010)

### 4. Recrutement sur le site d'abscission

Certaines des protéines qui interagissaient avec Polo sur le fuseau central permettent également sa localisation sur le site d'abscission, comme PRC1 et MKLP1. Polo est aussi recrutée sur le site d'abscission par Cep55, préalablement phosphorylé en début de mitose par CDK1 (Fabbro et al. 2005).

## D. Rôles de Polo

### 1. Régulation de l'entrée en mitose

Polo favorise l'entrée en mitose en phosphorylant CDC25 et WEE1, ce qui active CDC25 et inhibe WEE1, et donc indirectement induit l'activation de CDK1 (Vincent Archambault and Glover 2009). Des études ont montrées que l'activité de Polo n'est pas indispensable à l'activation de CDK1, mais que son inhibition entraîne un retard de l'entrée en mitose (Seki et al. 2008; Sumara et al. 2004). Cependant, une étude récente à montrée que Polo est nécessaire à l'entrée en mitose (Gheghiani et al. 2017).

Polo est également requise dans la reprise du cycle cellulaire en G2, après inactivation du DNA damage checkpoint. (voir section "II. La réponse aux dommages à l'ADN (DDR ou DNA Damage Response)" p55).

### 2. Régulation de l'APC/C

Polo est également impliqué dans la transition métaphase-anaphase. En début de mitose, l'APC/C est inhibée par le pseudosubstrat Emi1 (Early Mitotic Inhibitor). Chez l'humain, Emi1 est phosphorylée par Polo en prophase, générant un phosphodegron qui est reconnu par l'ubiquitine ligase SCF <sup>$\beta$ -TRCP</sup> et menant à la formation de Emi1 ubiquitinée. Le conjugué Emi1-ubiquitine est ensuite détruit par le protéasome, permettant l'activation de l'APC/C (Hansen et al. 2004; Moshe et al. 2004). De plus, Polo et CDK1 agissent synergiquement pour phosphoryler plusieurs sous-unités de l'APC/C et mener à son activation. *In vitro*, Polo peut phosphoryler plusieurs sous-unités de l'APC/C : Apc1, Cdc27, Apc5, Cdc16 and Cdc23. Ces phosphorylations augmentent l'activité d'ubiquitination de l'APC/C (Golan, Yudkovsky, and Hershko 2002; Kotani et al. 1998; Kraft et al. 2003).



### 3. Fonctions aux centrosomes

Polo est localisée sur les centrosomes pendant la mitose et régule leur disjonction et séparation permettant la formation du fuseau mitotique bipolaire.

Pendant l'interphase, les centrosomes dupliqués restent physiquement liés par un lien protéique contenant C-nap1 (Centrosomal NIMA-related kinase 2 (Nek2)-associated protein 1) et Rootletin. En prophase, C-nap1 et Rootletin sont phosphorylées par Nek2A (NIMA-related kinase), ce qui provoque leur dissociation des centrosomes et la disjonction de ces derniers. Chez l'humain, Polo augmente indirectement l'activité de Nek2A, ce qui a pour effet de promouvoir la disjonction des centrosomes (Mardin et al. 2011).

Polo est également impliquée dans la localisation au centrosome de Eg5 (en collaboration avec Cdk1) en début de mitose. Eg5 est une kinésine responsable de la séparation des centrosomes en prophase (Smith et al. 2011).

Plus globalement, en mitose, Polo induit des modifications du matériel péricentriolaire pour convertir les centrosomes en centres actifs de nucléation des microtubules et faciliter la formation du fuseau mitotique.

### 4. Fonctions aux centromères/kinétochores

Le rôle de Polo aux kinétochores est à la fois de réguler le recrutement et la dissociation des protéines du SAC, mais aussi de stabiliser l'attachement entre kinétochores et microtubules. Polo a des fonctions antagonistes sur le SAC selon le stade mitotique. En effet, en début de mitose, Polo favorise le recrutement des protéines du SAC sur le kinétochore alors qu'en métaphase, Polo favorise leur dissociation du kinétochore.

Chez l'humain, Polo favorise la mise en place du SAC en activant MPS1. De plus, Polo collabore avec MPS1 en phosphorylant certains motifs MELT de KNL1 (Suijkerbuijk, Vleugel, et al. 2012). Cependant, Polo n'est pas nécessaire au recrutement des protéines du SAC (Lénárt et al. 2007).

Il a été montré chez l'humain que Polo phosphoryle BubR1 sur son domaine KARD, ce qui induit le recrutement de PP2A par BubR1 (Suijkerbuijk, Vleugel, et al. 2012). Une fois sur le kinétochore, PP2A déphosphoryle les substrats de Aurora B, ce qui a pour effet

de stabiliser les interactions entre kinétochores et microtubules. De plus, PP2A déphosphoryle KNL1 afin de promouvoir le recrutement de PP1 et de dissocier les protéines du SAC du kinétochore (voir section "iiii. Inactivation du SAC" p26).

## 5. Cohésion des chromatides sœurs

En début de mitose, les chromatides sœurs sont reliés sur toute la longueur grâce à la caténation des brins ADN et par les cohésines. La cohésion des chromatides sœurs est importante lors de la mitose pour l'attachement bipolaire des chromosomes au fuseau mitotique et pour la distribution symétrique des chromosomes dans les cellules filles (Revue : Nasmyth, Peters, and Uhlmann 2000).

Chez les métazoaires, les cohésines sont dissociées des chromosomes en deux étapes, toutes deux régulées par Polo. En prophase/prométaphase, les cohésines sont enlevées des bras des chromosomes mais restent présentes au niveau du centromère jusqu'à la métaphase.

Chez l'humain, Polo, en collaboration avec CDK1, phosphoryle la sous-unité SA2 (homologue de SA), ce qui induit la dissociation des cohésines des bras de chromosomes (Hauf et al. 2005) en début de mitose. Les cohésines centromériques sont protégées par un complexe protéique formé au centromère, composé entre autre de Sgo1 (Shugoshine 1) et de la phosphatase PP2A. Ce complexe se lie aux cohésines centromériques et déphosphoryle SA2, ce qui préserve les cohésines aux centromères (H. Liu, Rankin, and Yu 2012). Chez la drosophile, c'est la protéine DMT (Dalmatian), localisée au niveau de l'ADN péri-centromérique, qui recrute PP2A au niveau des cohésines pour les protéger de la phosphorylation de Polo (Yamada et al. 2017).

Lors de la transition métaphase/anaphase, l'APC/C est activée et induit la dégradation de la sécurine qui séquestre normalement l'endopeptidase Séparase. La sous-unité SCC1 (RAD21 chez la drosophile) de la cohésine centromérique est alors clivée par la séparase ce qui permet la séparation des chromatides sœurs. Polo phosphoryle SCC1 pour permettre un clivage efficace de la sous-unité par la Séparase (Hauf et al. 2005). Une fois les cohésines centromériques clivées, la séparation des chromatides sœurs peut ainsi prendre place.

## 6. Cytocinèse et abscission

Pendant l'anaphase, Polo se relocalise des centrosomes et kinétochores vers la zone médiane du fuseau mitotique, où il va coordonner le recrutement de nombreuses protéines impliquées dans la régulation de la mitose. Lors de la formation du fuseau central, PRC1 (Feo chez la drosophile) interagit avec les microtubules et forme des homodimères permettant de lier entre eux des microtubules anti-parallèles (Schuyler, Liu, and Pellman 2003). Avant l'anaphase, la dimérisation de PRC1 est inhibée par Polo *via* la phosphorylation de sa Thr602. Cette phosphorylation génère en même temps un site d'attachement pour Polo. Cependant, CDK1 phosphoryle également PRC1 pour inhiber l'interaction entre Polo et PRC1. En anaphase, lorsque l'activité CDK1 diminue, Polo interagit avec PRC1. (Neef et al. 2007). Une fois au fuseau central, Polo phosphoryle des protéines moteurs telles que MKLP2 ou NudC, et active indirectement ECT2 (la Rho GEF de RhoA) puis RhoA *via* le recrutement du complexe centralspindlin (Pavarotti/MgcRacGAP), afin de réguler l'activité de la myosine lors de la mise en place de l'anneau contractile pendant la cytokinèse (Revue : Bruinsma, Raaijmakers, and Medema 2012; Revue : Petronczki, Lénárt, and Peters 2008; Burkard et al. 2009). Polo phosphoryle et active également CEP55, qui a pour rôle de regrouper les microtubules et qui est impliqué dans le recrutement de la machinerie nécessaire au mécanisme d'abscission (Fabbro et al. 2005).

## II. BubR1

BubR1 (Budding Unhhibited by Benomyl-Related 1), aussi appelé Bub1B chez l'humain et MAD3 chez la levure, a été découverte en 1991 grâce aux cribles de mutants qui ont permis l'identification des protéines du SAC chez la levure (voir section "i. Composants du SAC" p22) (Hoyt, Totis, and Roberts 1991). Lorsqu'elle a été identifiée chez la drosophile, BubR1 a tout d'abord été nommée Bub1.

BubR1 est une protéine qui est nécessaire à la signalisation du SAC, la stabilisation des attachements kinétochore-microtubules et la régulation de la durée de la mitose. Cette protéine possède également des fonctions non mitotiques qui seront décrites plus bas.

## A. Structure de BubR1

BubR1 est une protéine de 1050 acides aminés chez l'humain, 1460 acides aminés chez la drosophile. Elle est composée de multiples domaines et possède différents motifs qui sont décrits ci-dessous, de l'extrémité N-terminale à l'extrémité C-terminale (figure 11).

### 1. Domaine KEN

Le domaine situé en N-terminal de BubR1 est le plus conservé chez les eucaryotes. Nous l'appellerons domaine KEN (en violet clair, figure 11). Chez l'humain, ce domaine composé d'environ 350 acides aminés comprend deux motifs appelés KEN-box (lysine(K), glutamate(E), asparagine(N)) séparés par une série de répétitions TPR (tetratricopeptide repeats) composées de multiples motifs hélice-coude-hélice. Ces KEN-box sont nommées KEN1 et KEN2 (KEN1 étant la plus N-terminale) (Malureanu et al. 2009; V.M. Bolanos-Garcia et al. 2005). Entre les deux KEN-box se trouve une D-box (dead box), qui est une séquence d'acides aminés que tous les substrats de l'APC/C<sup>CDC20</sup> contiennent. Le consensus de cette séquence est R-X-X-L-X-X-X-N (X est un quelconque résidu) (Glotzer, Murray, and Kirschner 1991). De plus, la KEN2 est flanquée par deux motifs ABBA, très conservés. Ces motifs sont nommés ABBA car ils sont retrouvés dans les protéines Cycline A, BUBR1, BUB1 et Acm1 (Di Fiore et al. 2016).

Chez la drosophile, la configuration est similaire excepté que le second motif KEN est absent. Une KAN box (lysine(K), alanine(A), asparagine(N)) pourrait jouer le rôle de la deuxième KEN box (Duranteau, Montagne, and Rahmani 2016). Une étude phylogénétique de BubR1 suggère que la D-box et des séquences ABBA sont présentes chez la drosophile (Tromer et al. 2016).

Globalement, ce domaine KEN confère à BubR1 une fonction dans le SAC. En effet, les KEN box permettent à BubR1 d'interagir avec CDC20 lors de la formation du MCC. Les ABBA motifs sont aussi impliqués dans l'inhibition de l'APC/C<sup>CDC20</sup> par le MCC (Di Fiore et al. 2016).

Les répétitions TPR quant à elles participent au recrutement de BubR1 sur les kinétochores en interagissant avec KNL1 du complexe KMN (voir section "c. Outer kinétochore" p17).

## 2. Domaine "Bub3 Binding Domain"

Le second domaine, également conservé chez les eucaryotes, est appelé Bub3 Binding Domain ou Glebs (Gle2 Binding Site) (en vert, figure 11). Il contient une quarantaine d'acides aminés qui interagissent avec le domaine WD40 de Bub3, qui est une structure circulaire formée de séquences répétées d'acides aminés. Ce domaine est nécessaire à l'interaction entre BubR1 et Bub3 et permet le recrutement de BubR1 sur les kinétochores (Taylor, Ha, and McKeon 1998).

## 3. Phe-box et D-box

Entre le domaine Bub3 Binding Domain et le domaine KARD se trouve une Phe-box (Phenylalanine box) et une seconde D-box qui interagissent avec CDC20 et stabilisent le MCC (Diaz-Martinez et al. 2015).

## 4. Domaine 3

BubR1 de *Drosophila* contient un domaine structuré peu conservé que nous avons appelé domaine 3. Ce domaine contient également un motif ABBA identifié chez BubR1 humain (Diaz-Martinez et al. 2015). Deux séquences ABBA semblent présentes dans ce domaine chez la drosophile (Tromer et al. 2016).

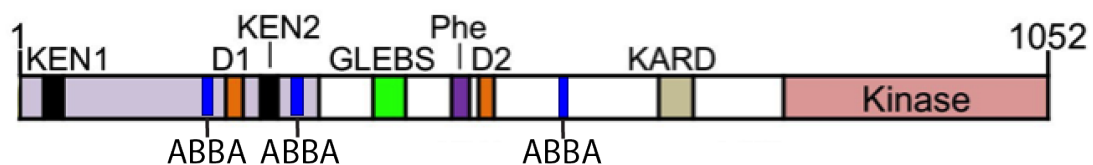
## 5. Domaine KARD

Le motif KARD (Kinetochores Attachment Regulatory Domain) (en gris, figure 11) a été identifié en premier lieu dans la séquence de BubR1 humain. Ce domaine correspond aux sérine 670, sérine 676 et thréonine 680 chez l'humain. Ces résidus sont phosphorylés par Polo et CDK1 et permettent le recrutement de PP2A-B56 $\alpha$  au kinétochore. L'activité

phosphatase de PP2A-B56 $\alpha$  aux kinétochores déphosphoryle les substrats d'Aurora B et contrecarre ainsi l'action de déstabilisation des interactions kinétochores microtubules d'Aurora B (Kruse et al. 2013; Suijkerbuijk, Vleugel, et al. 2012). Ce domaine est ainsi impliqué dans la stabilisation des interactions kinétochore-microtubules et dans la congression des chromosomes.

## 6. Domaine kinase

A l'extrémité C-terminale, se trouve un domaine sérine-thréonine kinase (en rose, figure 11) qui est absent chez MAD3, l'homologue de BubR1 chez la levure (Hardwick et al. 2000). Chez la drosophile, ce domaine est requis pour la formation correcte des attachements kinétochore-microtubules. Cependant, ce rôle est plus controversé dans d'autres modèles. En effet, certaines études chez les mammifères montrent que l'activité kinase de BubR1 est importante pour la capture et la congression des chromosomes, tandis que d'autres études montrent que ce rôle est minime (J. Zhang, Ahmad, and Mao 2007; H. Huang and Yen 2009; Malureanu et al. 2009; Elowe et al. 2007). Certains résidus normalement conservés dans les domaines kinases et impliqués dans l'activité catalytique, sont dégénérés chez les vertébrés. Ainsi, cette protéine est parfois considérée comme une pseudo-kinase chez les vertébrés. Chez l'humain, BubR1 semble conserver malgré tout une activité kinase (Suijkerbuijk, van Dam, et al. 2012).



**Figure 11 : Les différents domaines de BubR1.** Sont représentés : le domaine KEN (violet clair), les KEN Box (noir), les motifs ABBA (bleu), les D-box (orange), le Bub3 Binding Domain (Glebs) (vert), la Phe Box (violet foncé), le domaine KARD (gris) et le domaine kinase (rose). (Modifiée de Tromer et al. 2016)

## B. Localisation de BubR1 à travers le cycle cellulaire

BubR1 est une protéine cytoplasmique en interphase et commence à être recrutée au kinétochore en prophase/prométaphase. BubR1 disparaît progressivement des kinétochores à la transition métaphase/anaphase, jusqu'à être totalement absente des kinétochores en fin d'anaphase (Hoffman et al. 2001).

### 1. Recrutement de BubR1 aux kinétochores

Les protéines impliquées dans le recrutement de BubR1 aux kinétochores sont Bub3, Bub1, MPS1 et KNL1.

Bub3 est le cofacteur majeur du recrutement de BubR1 et Bub1 au kinétochore. Bub3 contient un motif WD40 qui correspond à une structure en  $\beta$ -hélice à 7 lames formant une surface circulaire autour d'un pore central (Primorac et al. 2013). Chez l'humain, l'interaction de Bub3 avec BubR1 et Bub1 se fait *via* la région du pore central de Bub3 et le domaine Glebs de BubR1 et Bub1 (F. Prinz et al. 2016)(Taylor, Ha, and McKeon 1998). Le recrutement de BubR1 au kinétochore chez l'humain est dépendant de Bub1 et Bub3 (Overlack et al. 2015). Un premier dimère de Bub1 et Bub3 est recruté sur le kinétochore, *via* l'interaction de Bub3 avec KNL1. Un second dimère, composé de BubR1/Bub3, est ensuite recruté au kinétochore *via* une double interaction. BubR1 interagit avec Bub1 et Bub3 interagit avec KNL1 (Overlack et al. 2015). Les dimères sont recrutés au kinétochores par Bub3, qui interagit avec les multiples motifs MELT (Met-[Glu/Asp]-[Leu/Ile/Val/Met]-Thr) de KNL1, préalablement phosphorylés sur la thréonine par la kinase MPS1. Bub3 agit comme une plateforme pour ses partenaires BubR1 et Bub1 (Primorac et al. 2013). De nombreuses études chez l'humain révèlent que KNL1 est l'acteur majeur du recrutement de BubR1 au kinétochore. Cependant, chez la Drosophile, KNL1 n'est pas nécessaire au recrutement de BubR1 (Schittenhelm, Chaleckis, and Lehner 2009). La suppression de KNL1 (appelé SPC105) n'entraîne qu'une diminution de 30% du recrutement de BubR1 au kinétochore. Des résultats suggèrent qu'il pourrait exister une voie alternative de recrutement au kinétochore pour Bub1. En effet, des expériences d'interaction en double hybride chez la levure montre que Bub1 interagit avec la protéine Nls1 du complexe Mis12 (Schittenhelm, Chaleckis, and Lehner

2009). La forte homologie entre BubR1 et Bub1 permet de penser que BubR1 pourrait également être recruté au kinétochore via cette voie alternative.

Le rôle de Bub1 dans le recrutement de BubR1 est variable selon les espèces. Chez les mammifères ou le xénope, la déplétion de Bub1 réduit mais ne supprime pas le recrutement de BubR1 au kinétochore (Boyarchuk et al. 2007; Johnson 2004), alors que chez la levure, Bub1 est nécessaire et suffisante au recrutement de BubR1 sur les kinétochores (Rischitor, May, and Hardwick 2007). Chez la Drosophile, la déplétion de Bub1 empêche le recrutement de Bub3 au kinétochore, ce qui permet de penser que le recrutement de BubR1 serait également dépendant de Bub1 (J. Basu et al. 1998). Chez l'humain, la Drosophile et le Xénope, le rôle de Bub1 dans le recrutement de BubR1 n'est pas dépendant du domaine kinase de Bub1, ce qui suggère que Bub1 agit comme une protéine d'échafaudage (Vleugel et al. 2015; Sharp-Baker and Chen 2001; Joydeep Basu et al. 1999).

Chez l'humain, les répétitions TPR du domaine KEN de BubR1 interagissent également directement avec deux motifs KI (Lys-Iso) présents dans KNL1. Cependant, la mutation des motifs KI de KNL1 ou des répétitions TPR de BubR1 n'affectent pas la localisation de BubR1 au kinétochore, ce qui indique que cette interaction n'est ni suffisante, ni nécessaire au recrutement correct de BubR1 au kinétochore (Krenn et al. 2012; Krenn et al. 2014). Ces motifs n'ont pas été clairement identifiés chez la drosophile.

D'autres protéines participent au recrutement de BubR1 sur les kinétochores, comme les kinases Aurora B et Polo. La kinase Aurora B est impliquée indirectement dans le recrutement de BubR1, en stimulant l'activation et le recrutement au kinétochore de MPS1 (Saurin et al. 2011) et Polo active MPS1 par phosphorylation directe et coopère avec MPS1 pour phosphoryler les motifs MELT de KNL1 (von Schubert et al. 2015, 1).

## 2. Les rôles de BubR1

### a. Le rôle de BubR1 dans le SAC

Le rôle du SAC est d'inhiber l'ubiquitination de la cycline B et de la sécurine par l'APC/C. Cette inhibition est médiée par le MCC composé de CDC20, MAD2, Bub3 et BubR1. BubR1 est une sous-unité clef du MCC. Il a été montré *in vitro* que le complexe



BubR1-Bub3-CDC20 (BCC) est suffisant pour inhiber l'APC/C, cependant avec une efficacité moindre que le MCC (Fang 2002, 1; Tang et al. 2001).

CDC20 est le cofacteur de l'APC/C qui a pour rôle de reconnaître la KEN-box et les D-box sur les substrats de l'APC/C. L'interaction entre BubR1 et CDC20 est indispensable à la formation du MCC et nécessite la reconnaissance de la KEN1 de BubR1 par un motif DYY de CDC20 (Asp184, Tyr185, and Tyr186 chez l'humain, Asp210, Tyr211, and Tyr212 chez la Drosophile) (Tian et al. 2012; Derive et al. 2015, 1). La formation du MCC entraîne l'inhibition de l'APC/C (voir section "iii. Inhibition de l'APC/C" p24).

De plus, le complexe BubR1-CDC20 inhibe l'activité de l'APC/C, en jouant le rôle de pseudosubstrat. La KEN2 et les séquences ABBA de BubR1 permettent à ce complexe d'interagir avec une deuxième sous-unité CDC20 liée dans un complexe actif APC/C<sup>CDC20</sup> (Di Fiore et al. 2015; Izawa and Pines 2014). Une fois BubR1-CDC20 liés à l'APC/C<sup>CDC20</sup>, les KEN-box et la D-box de BubR1 sont reconnues par l'APC/C et entrent en compétition avec les substrats de l'APC/C, inhibant l'activité de cette dernière (Tian et al. 2012; J. L. Burton and Solomon 2007). Afin d'éviter que BubR1 ne soit ubiquitinée et dégradée après reconnaissance par l'APC/C, elle est préalablement acétylée sur les kinétochores non attachés. Il a été montré que BubR1 est acétylée sur la Lys250 en interagissant avec BRCA2 et l'acétyltransférase PCAF sur les kinétochores non attachés (Choi et al. 2012, 2, 2009).

Les répétitions TPR de BubR1 sont également impliquées dans l'interaction de BubR1 avec CDC20. En effet, les mutations affectant l'intégrité du domaine TPR empêchent BubR1 de se lier à CDC20 (Lara-Gonzalez et al. 2011).

## b. Le rôle de BubR1 dans l'attachement kinétochore-microtubules

BubR1 est une protéine connue pour être hyperphosphorylée en mitose et son degré de phosphorylation est corrélé avec le nombre de kinétochores non attachés aux microtubules. Chez l'humain, BubR1 est phosphorylée sur de nombreux sites (Ser435, Ser543, Thr608, Thr620, Ser670, Ser676, Thr680, Thr792, Thr1008, Ser1043) et toutes ces phosphorylations sont impliquées dans la stabilisation des attachements kinétochore-microtubules.

### *i. Phosphorylation du domaine KARD*

La phosphorylation par Polo et CDK1 du domaine KARD de BubR1 sur les résidus Ser670, Ser676 et Thr680 induit l'interaction de ce domaine KARD avec la sous-unité B56 $\alpha$  de la phosphatase PP2A (Elowe et al. 2007; Suijkerbuijk, Vleugel, et al. 2012; Kruse et al. 2013). MPS1 participe également à la phosphorylation du domaine KARD en phosphorylant la Ser670 (H. Huang et al. 2008, 1). L'affinité de B56 $\alpha$  pour BubR1 augmente en fonction du nombre de ses phosphorylations. Le recrutement de PP2A-B56 $\alpha$  au kinétochore contrecarre les effets déstabilisateurs de la kinase Aurora B, entraînant une stabilisation des attachements kinétochores-microtubules (voir section "b. Correction de l'attachement kinétochore-microtubules" p20). La phosphorylation de Thr620 de BubR1 par CDK1 permet l'interaction de Polo avec BubR1 (Elowe et al. 2007).

BubR1 est également capable de s'autophosphoryler sur sa Thr608 et cette phosphorylation est dépendante de CENP-E qui stimule son activité kinase (Mao, Desai, and Cleveland 2005; Guo et al. 2012).

### *ii. Phosphorylation du domaine kinase*

BubR1 est considérée comme une pseudokinase chez certains vertébrés. Cependant, plusieurs études montrent que la phosphorylation par Polo des résidus Thr792 et Thr1008 et par MPS1 de la Ser1043 de ce domaine augmente son activité et stabilise les attachements kinétochores-microtubules, en activant le domaine kinase de BubR1 (Matsumura, Toyoshima, and Nishida 2007). MPS1 phosphoryle également la Ser1043 dans le domaine kinase (H. Huang et al. 2008)

Chez la drosophile, le domaine kinase de BubR1 est connu pour être fonctionnel. L'étude du phénotype du mutant *BubR1-kinase dead* a montré que les individus étaient viables et fertiles, mais qu'en mitose, la mise en place du fuseau bipolaire et la congression des chromosomes étaient ralenties et que l'alignement des chromosomes sur la plaque métaphasique était instable (Rahmani et al. 2009). Le rôle du domaine kinase serait de phosphoryler des protéines associées aux extrémités (+) des microtubules, ayant pour effet de stabiliser les interactions kinétochore-microtubules (J. Zhang, Ahmad, and Mao 2007).

### c. Le rôle de BubR1 dans la régulation de la durée de la mitose

Pendant la division cellulaire, la progression de la mitose doit être régulée temporellement pour permettre la ségrégation correcte des chromosomes. Il existe un intervalle de temps minimum entre la NEB en prophase et le début de l'anaphase. La cellule ne passera pas en anaphase avant ce délai même lorsque tous les chromosomes sont correctement attachés aux microtubules. BubR1 et MAD2 jouent un rôle conservé dans le maintien de ce délai (Buffin, Emre, and Karess 2007; Rahmani et al. 2009; Meraldi, Draviam, and Sorger 2004). BubR1 et MAD2 font probablement partie d'un complexe, similaire ou identique au MCC, qui existe avant le début de la mitose. Ce complexe inhiberait l'APC/C avant que ne soit mis en place le SAC et évite donc une sortie prématurée de mitose.

### d. Les fonctions non mitotiques de BubR1

Bien que les fonctions majeures de BubR1 concernent la régulation de la mitose, BubR1 a été impliquée dans d'autres processus tels que la méiose, la formation des centrosomes en interphase et des cils ainsi que la réponse aux dommages à l'ADN.

Chez les mammifères, les fonctions mitotiques majeures de BubR1 dans la régulation du SAC et dans le renforcement des attachements kinétochore-microtubules sont également requises en méiose. De plus, chez la drosophile, BubR1 aurait une autre fonction en méiose, qui serait de renforcer la cohésion entre les chromatides soeurs *via* la régulation du complexe synaptonémal et des cohésines. (Malmanche et al. 2007).

Il a également été montré chez l'humain que BubR1 était impliquée dans la régulation de la duplication des centrosomes, sa mutation ayant pour effet la multiplication des centrosomes et par conséquent l'apparition de mitoses multipolaires. Le rôle de BubR1 serait de prévenir l'amplification inappropriée des centrosomes en inhibant l'activité de Polo aux centrosomes (Izumi et al. 2009).

Chez l'humain et chez le médaka (une espèce de poisson), BubR1 est également impliquée dans la formation du cil primaire. Le cil primaire est une extension cytoplasmique formée à partir de microtubules émanant du centrosome présent à la surface de la majorité des cellules non mitotiques. La formation de cet organite requiert

le positionnement du centrosome au pôle apical de la cellule. BubR1 contrôle indirectement le positionnement du centrosome. BubR1 inhibe CDC20, ce qui favorise l'activité de l'APC/C<sup>CDH1</sup>. L'APC/C<sup>CDH1</sup> régule une protéine de polarité impliquée dans le positionnement du cil primaire (Miyamoto et al. 2011).

BubR1 est également impliquée dans la réponse aux dommages à l'ADN, ce point sera développé dans le chapitre correspondant (voir section "Chapitre 4 : Problématiques et objectifs de thèses" p67).

### III. Aurora B et le Chromosomal Passenger Complex

Aurora B est une sérine thréonine kinase qui a été découverte chez la levure en 1993 (sous le nom de IPL1 ou Increase In-Ploidy 1) par un crible génétique dont l'objectif était de trouver des gènes impliqués dans la ségrégation des chromosomes (C. Chan and Botstein 1993; Francisco, Wang, and Chan 1994). Deux années plus tard, en 1995, Aurora B a été identifiée lors d'un crible chez la drosophile. Plusieurs mutants femelles stériles dont les embryons présentaient des défauts de mitose ont été isolés lors de ce crible (Glover et al. 1995). Aurora B fait partie d'un complexe protéique hautement conservé appelé CPC (Chromosomal Passenger Complex), composé des protéines Aurora B, Boréaline, Survivine et INCENP. Ce complexe peut être subdivisé en deux modules distincts : un module catalytique responsable de l'activité kinase, composé de Aurora B et d'une partie de INCENP, et un module de localisation composé de INCENP, Boréaline et Survivine. Chez la drosophile, il existe deux paralogues de Boréaline appelé Borr (Borealin-related) et Aust (Australin) (Gao et al. 2008).

#### A. Localisation et recrutement du CPC

Le CPC a une localisation dynamique tout au long du cycle cellulaire. En interphase, le CPC se localise sur la chromatine. En prophase précoce, le CPC se localise sur les bras de chromosomes puis se confine aux centromères en fin de prophase jusqu'en anaphase.

Pendant l'anaphase, le CPC est transloqué sur les microtubules du fuseau central pour finir sur le site d'abscission en télophase.

## 1. Localisation sur les chromosomes et au centromère

L'enrichissement du CPC sur les chromosomes et aux centromères résulte de la phosphorylation de deux histones, H3 et H2A.

En mitose, l'histone H3 relocalise au niveau des centromères après avoir été phosphorylée sur la Thr3 (H3T3) par la kinase Haspin. Une fois phosphorylée, H3 interagit directement avec la Survivine, ce qui permet le recrutement du CPC. Aurora B participe à son propre recrutement en phosphorylant la kinase Haspin, ce qui a pour effet de faciliter la phosphorylation de l'histone H3 (Wang et al. 2011).

L'histone H2A est phosphorylée sur la thréonine 120 par Bub1, ce qui induit le recrutement des protéines SGO1 et SGO2 (Shugoshine 1 et 2). Ces protéines vont ensuite interagir avec la Boréoline (chez l'humain) ou la Survivine (chez la levure *S. pombe*) préalablement phosphorylées par CDK1, et donc promouvoir le recrutement du CPC (Tsukahara, Tanno, and Watanabe 2010; Kawashima et al. 2007). Chez la drosophile, le recrutement de MeiS332, homologue des SGO, et du CPC au centromère est interdépendant. MeiS332 interagit avec INCENP, puis est phosphorylée par Aurora B. MeiS332 phosphorylée est ensuite recrutée aux centromères, accompagnée du CPC (Resnick et al. 2006).

## 2. Localisation au fuseau central

En métaphase, l'activité de CDK1 diminue et les phosphatases PP1 et PP2A sont activées, entraînant la déphosphorylation de nombreux substrats. Ces événements provoquent notamment la relocalisation du CPC des centromères vers le fuseau central.

La déphosphorylation de H3T3 par PP1 induit la dissociation du CPC des centromères (Qian et al. 2011). De plus, Aurora B est ubiquitiné par deux E3 ubiquitine ligases, ce qui provoque son retrait des chromosomes par une ATPase (AAA+ ATPase Cdc48/p97) accompagnée d'une protéine adaptatrice (Ufd1-Npl4) (Dobrynin et al. 2011,

97). Ces deux mécanismes facilitent sa relocalisation sur les microtubules du fuseau central.

Une fois le CPC dissocié des centromères, INCENP et Aurora B interagissent avec une kinésine, MKLP2 chez l'humain et Subito chez la drosophile, qui se lie aux microtubules du fuseau central (Gruneberg et al. 2004; Cesario et al. 2006). Avant l'anaphase, cette interaction entre le CPC et MKLP2 est inhibée par des phosphorylations inhibitrices médiées par CDK1 (Gruneberg et al. 2004).

### 3. Localisation au site d'abscission

Chez la drosophile et chez l'humain, la localisation du CPC au site d'abscission est maintenue par l'interaction de la Borealine avec la sous-unité Shrb chez la drosophile ou Snf7 chez l'humain, d'un complexe régulateur de l'abscission appelé ESCRT-III (Endosomal Sorting Complex Required for Transport-III) (Capalbo et al. 2012).

## B. Activation de Aurora B

L'expression des protéines du CPC commence en G2 et l'activation de Aurora B a lieu lors de la formation du complexe CPC. Aurora B interagit avec INCENP, ce qui modifie la conformation de Aurora B et INCENP et confère à Aurora B une faible activité kinase. Ceci permet à Aurora B de phosphoryler INCENP ainsi que de s'auto-phosphoryler sur la Thr232 présente dans la T-loop de son domaine kinase, menant à son activation complète (Honda, Körner, and Nigg 2003).

Les protéines favorisant un enrichissement localisé du CPC stimulent également l'activité kinase puisqu'elles favorisent l'auto-phosphorylation de Aurora B. D'autres évènements participent à l'activation de Aurora B tel que la phosphorylation de Aurora B sur Ser311 par Chk1, une kinase du DNA Damage Checkpoint (Petsalaki et al. 2011) ainsi que la phosphorylation de la Survivine par Polo qui promeut le recrutement du CPC aux centrosomes (Chu et al. 2011).

## C. Fonctions de Aurora B

Aurora B est une protéine impliquée dans de nombreuses fonctions mitotiques et ceci est rendu possible de part sa localisation dynamique pendant la mitose décrite ci-dessus.

### 1. Régulation de la condensation des chromosomes

Chez la drosophile et l'humain, Aurora B phosphoryle la Ser10 de l'histone H3 afin de promouvoir le recrutement de la condensine I sur la chromatine (Giet and Glover 2001; Lipp et al. 2007).

De plus, chez l'humain, Aurora B phosphoryle les sous-unités régulatrices (non-SMC) de la condensine I afin de promouvoir l'interaction de cette dernière avec l'histone H2A (Lipp et al. 2007; Tada et al. 2011).

Ainsi, Aurora B participe à la condensation de la chromatine lors de l'entrée en mitose.

### 2. Correction des attachements kinétochore-microtubules incorrects

Pendant la mitose, chacune de deux chromatides sœurs doit être attachée à un pôle opposé du fuseau mitotique bipolaire (attachement amphitélétique du chromosome). Cependant, il se produit des erreurs d'attachements appelés attachements synthéliques et mérotéliques (voir section "

B. Le fuseau mitotique" p12). L'un des rôles de Aurora B est de déstabiliser ces attachements incorrects (Hauf et al. 2003; Lampson et al. 2004). Pour cela, Aurora B phosphoryle les composants du complexe KMN, ce qui a pour effet de diminuer l'affinité entre le complexe KMN et les microtubules (DeLuca et al. 2006; Cheeseman et al. 2006). De plus, Aurora B phosphoryle d'autres composants du kinétochore qui coopèrent avec le

complexe KMN pour lier les microtubules. Chez la levure, le complexe Dam1 (analogue du complexe Ska chez les métazoaires) forme un anneau autour des microtubules pour favoriser leur stabilisation et interagit avec la sous-unité Ndc80 du complexe KMN. La phosphorylation de Dam1 par Aurora B entraîne une diminution des interactions entre Dam1, NDC80 et les microtubules (Tien et al. 2010).

Lorsque les kinétochores des chromatides sœurs sont attachés chacun à un pôle du fuseau mitotique (attachements amphitéliques), cela génère une tension qui éloigne les centromères des kinétochores et par conséquent éloigne Aurora B de ses substrats kinétochoriens. Ces substrats ne sont plus phosphorylés par Aurora B et sont déphosphorylés par PP1 et PP2A, ce qui entraîne une stabilisation des attachements kinétochore-microtubules (Revue : Lampson and Cheeseman 2011; Dan Liu et al. 2010; D. Liu et al. 2009).

### 3. Régulation du Spindle Assembly Checkpoint (SAC)

Aurora B est impliquée dans la mise en place du SAC, son inhibition abolissant le recrutement des protéines du SAC. Sa fonction est de phosphoryler le domaine N-terminal de NDC80 afin de promouvoir le recrutement de MPS1 sur le kinétochore (Santaguida et al. 2010; T. Zhu et al. 2013). Une fois sur le kinétochore, MPS1 va induire le recrutement de toutes les autres protéines du SAC et permettre la formation du MCC

### 4. Formation et stabilisation du fuseau central

La formation du fuseau central requiert l'action à la fois de la protéine PRC1 et du complexe centralspindlin (composé de MKLP1 et MgcRacGAP) pour leur activité de pontage des microtubules, et aussi de la kinésine KIF4 qui contrôle la taille des microtubules au niveau du fuseau central. Aurora B est requise pour la localisation du complexe centralspindlin sur le fuseau central. La phosphorylation de MKLP1 par Aurora B induit l'accumulation du complexe centralspindlin sur le fuseau central et augmente son activité de pontage des microtubules (Douglas et al. 2010). Aurora B phosphoryle également KIF4 afin de promouvoir son recrutement sur le fuseau central *via* l'interaction de KIF4 avec PRC1 (Nunes Bastos et al. 2013).



## 5. Assemblage de l'anneau contractile

Le positionnement du site d'assemblage de l'anneau d'actomyosine et sa constriction sont coordonnés avec la ségrégation des chromosomes pour permettre une répartition du génome précise. Le CPC joue un rôle important dans la coordination et la régulation de ces processus.

En parallèle de la mise en place du fuseau central, le site de clivage est positionné et un anneau contractile s'assemble. Le complexe centralspindlin présent au niveau du fuseau central se lie à la Rho GEF Ect2 qui active la petite GTPase RhoA (Wadsworth 2005). Cette GTPase possède de nombreux effecteurs favorisant la polymérisation de l'actine et l'activation de la myosine, induisant ainsi l'assemblage et la constriction de l'anneau (Yüce, Piekny, and Glotzer 2005). Aurora B promeut le recrutement du complexe centralspindlin, qui à son tour recrute Ect2. De plus, Aurora B phosphoryle et active une sous-unité du complexe centralspindlin, MgcRacGAP, qui à son tour va activer RhoA (Minoshima et al. 2003).

Enfin, le CPC régule indirectement la formation de cet anneau contractile. En effet, avant l'anaphase, Aurora B empêche l'assemblage prématuré de l'anneau contractile, en phosphorylant GEF-H1, une protéine qui couple la dynamique des microtubule avec l'activité de RhoA. Sa phosphorylation prévient le recrutement et l'activation de RhoA au cortex (Birkenfeld et al. 2007).

## 6. Cytocinèse

Pour finir, Aurora B est également impliquée dans le checkpoint d'abscission qui retarde l'abscission en présence de chromatine au niveau de la jonction intercellulaire (Steigemann et al. 2009; Norden et al. 2006) et régule la reformation de l'enveloppe nucléaire (Afonso et al. 2014).

# Chapitre 3 : La réponse aux dommages à l'ADN

L'intégrité du génome de chaque cellule est en permanence menacée par des agents délétères qui causent plusieurs milliers de lésions de l'ADN par jour.

Certains de ces agents proviennent de sources endogènes. Le métabolisme cellulaire normal produit des espèces réactives de l'oxygène (Reactive Oxygen Species ou ROS), sources de nombreux dommages. Des erreurs durant le processus de réplication de l'ADN peuvent également générer des dommages à l'ADN.

D'autre part, les sources de lésions de l'ADN peuvent être exogènes. L'environnement soumet en permanence l'organisme à différentes agressions, telles le rayonnement ultraviolet, les rayonnements ionisants ou des agents génotoxiques. Certaines molécules toxiques pour l'ADN sont aussi utilisées comme outil thérapeutique, notamment en chimiothérapie et peuvent générer des altérations.

Tous ces agents génèrent des lésions de natures très diverses. Ces lésions entraînent une réponse de la cellule, qui va bloquer le cycle cellulaire et mettre en place un système de réparation de l'ADN.

## I. Les différents types de dommages à l'ADN

### A. Dommage au niveau des bases de l'ADN

Selon les sources, les dommages au niveau de l'ADN peuvent être divers. Les ROS et les rayonnements ionisants provoquent de nombreuses altérations, telles que des oxydations, des réductions ou encore des fragmentations de bases azotées. Les UV sont plutôt responsables de la formation de dimères de thymine qui bloquent la réplication de l'ADN s'ils ne sont pas éliminés et corrigés, mais peuvent aussi indirectement altérer les bases azotées en générant des ROS. De nombreux agents chimiques peuvent également endommager les bases tels les agents alkylants (contenus par exemple dans la fumée de cigarette) ou certaines drogues antitumorales. L'éthyl méthyl sulfonate (EMS) notamment, est un agent alkylant utilisé pour provoquer des mutations ponctuelles et

réaliser des cribles génétiques chez la drosophile. L'EMS alkyle les guanines qui, lorsqu'elles ne sont pas remplacées par les systèmes de réparation, seront reconnues comme des adénines lors de la réplication et changeront la séquence nucléotidique initiale. Toutes ces modifications de bases azotées peuvent engendrer des mutations modifiant les séquences protéiques qui peuvent être délétères pour la cellule.

## B. Les pontages intra- et inter-brin

Les pontages intra- et inter-brin sont des liaisons covalentes entre deux bases d'un même brin ou de deux bases de brins complémentaires respectivement. Ils sont induits par des agents alkylants. Les pontages inter-brin empêchent l'ouverture des deux brins d'ADN et bloquent la transcription et la réplication (Y. Huang and Li 2013). Les pontages intra-brins sont moins toxiques car ils peuvent être contournés par certaines ADN polymérases.

## C. Les cassures simple-brin de l'ADN

La cassure simple-brin (Single Strand Break ou SSB) est le dommage à l'ADN le plus fréquent. Elle sont le plus souvent provoquées par les ROS, mais peuvent également apparaître lors d'erreurs commises par des enzymes cellulaires telle que la topoisomérase 1, qui génère des coupures simple-brin transitoires dans la molécule d'ADN. Les SSB non réparées engendrent des problèmes pour la cellule. Dans les cellules en prolifération, les SSB bloquent la fourche de réplication pendant la phase S et peuvent provoquer des cassures double-brin (Double Strand Break ou DSB) (Saleh-Gohari et al. 2005). Dans les cellules en interphase, la présence de SSB peut aussi bloquer l'ARN polymérase lors de la transcription de gènes, ce qui peut induire la mort de la cellule (Revue : Abrahams and Geschwind 2008).

## D. Les cassures double-brin de l'ADN

La cassure double-brin ou DSB est le dommage le plus délétère pour la cellule. Ces cassures sont causées par des rayons ionisants, des drogues ou encore lors de problèmes pendant la réplication. Les DSB sont également générées de manière physiologique, par exemple lors de la recombinaison méiotique pour augmenter le brassage génétique. Pour une cellule humaine, il est estimé qu'environ 50 DSB apparaissent par cycle cellulaire (Revue : Mehta and Haber 2014). Les DSB peuvent être la cause de délétion, de translocation et de fusion dans l'ADN (Qiu et al. 2017). De plus, lorsqu'elles sont présentes en mitose, les DSB séparent les chromosomes en deux parties, l'une contenant le centromère appelée fragment de chromosome centrique, et l'autre partie sans centromère appelée fragment de chromosome acentrique. Cette partie acentrique n'étant plus reliée par le centromère/kinétochore au fuseau mitotique, elle peut subsidiairement ségréger aléatoirement dans la cellule fille opposée pour s'y retrouver avec la copie présente sur la chromatide sœur. Ainsi des cellules filles aneuploïdes sont générées. Au cours de cette thèse, je me suis intéressée aux mécanismes permettant de protéger les cellules de cette situation délétère.

## II. La réponse aux dommages à l'ADN (DDR ou DNA Damage Response)

### A. Mise en place de la DDR

Tous les dommages à l'ADN cités précédemment peuvent être létaux pour des organismes unicellulaires ou peuvent engendrer l'apparition de tumeurs chez les organismes pluricellulaires (Revue : Ciccia and Elledge 2010). La présence d'une lésion au sein de la molécule d'ADN est immédiatement repérée et prise en charge par des protéines spécialisées. Ces senseurs vont activer des transducteurs qui amplifieront le signal et permettront aux effecteurs de réguler la réponse de la cellule. En réponse à ces dommages, la cellule peut moduler le cycle cellulaire, réguler la transcription de certains gènes, réparer l'ADN ou bien entrer en apoptose (Revue : Ciccia and Elledge 2010).

Nous allons nous intéresser ici à la réponse aux cassures double brin (DSB : Double Strand Break).

La présence de DSB est détectée par le complexe MRN (Mre11, Rad50 et NBS1) qui va promouvoir le recrutement et l'activation de kinases de la famille des phosphatidylinositol 3 (PI3) related-kinases, ATM (Ataxia Telangiectasia mutated) et ATR (Ataxia telangiectasia and Rad3-related protein).

Les kinases ATM et ATR initient ensuite la réponse aux DSB en s'autophosphorylant et en phosphorylant de nombreuses protéines transductrices (Matsuoka et al. 2007). Ainsi, ATR phosphoryle et active la kinase Chk1 (Checkpoint Kinase 1), avec l'aide de la protéine Claspin, et ATM phosphoryle Chk2, entraînant sa dimérisation requise pour son activation (Revue : Patil, Pabla, and Dong 2013; Cai, Chehab, and Pavletich 2009). Chk1 et Chk2 ont pour rôle de propager le signal dans tout le noyau afin de réguler des facteurs de transcription, des régulateurs du cycle cellulaire, la machinerie apoptotique et les facteurs de réparations de l'ADN (Bartek and Lukas 2003).

## B. La chromatine au cours de la DDR

La compaction de la chromatine empêche les enzymes de réplication, de transcription et de réparation d'accéder à l'ADN. Lors de dommages à l'ADN en interphase, la structure de la chromatine est modifiée. ATM induit la dissociation des nucléosomes et inhibe l'activité de protéines impliquées dans la compaction de l'ADN comme HP1 (Heterochromatine Protein 1), ce qui provoque une décondensation locale et transitoire de la chromatine, et permet aux protéines de signalisation et de réparation d'accéder à la lésion (Berkovich, Monnat, and Kastan 2007; Kruhlak et al. 2006; Ayoub et al. 2008). Suite à la décondensation, la chromatine se recondense fortement. Cette recondensation stimule la signalisation de la DDR (Burgess et al. 2014). Le changement de structure de l'ADN est induit par des modifications d'histones, le recrutement de protéines régulatrices de la structure de l'ADN, des incorporations de variants d'histones, des repositionnements d'histones, et des méthylations de l'ADN.

## 1. Modification des histones

L'une des modifications des histones la plus connue est la phosphorylation de la Ser 129 de l'histone H2AX (H2Av chez la drosophile) par ATM et ATR (appelée  $\gamma$ H2AX après phosphorylation) (Burma et al. 2001).

$\gamma$ H2AX sert ensuite de ligand pour le recrutement de protéines à domaine BRCT comme MDC1 (Mu2 chez la Drosophile), qui à son tour recrute de nombreuses protéines de la DDR (Stucki and Jackson 2006). L'interaction entre MDC1 et  $\gamma$ H2AX permet ensuite d'amplifier le recrutement d'autres facteurs de la DDR comme 53BP1 (p53 binding protein), le complexe MRN et la forme phosphorylée d'ATM (Stucki et al. 2005; Lou et al. 2006, 1).

Lors de la DDR, certaines histones peuvent aussi être ubiquitinées. Le recrutement de MDC1 par  $\gamma$ H2AX induit la fixation de groupements ubiquitines sur les histones H2A, H2B et H2AX au niveau de la lésion. Par exemple, l'ubiquitine ligase RNF8 catalyse la fixation de chaînes poly-ubiquitines sur les histones H2A et H2AX. Ces groupements ubiquitines sont à leur tour responsable du recrutement d'autres protéines de la DDR, comme BRCA1 (Sobhian et al. 2007).

La protéine TIP60, recrutée par MDC1, possède une activité d'acétylation et contrôle des échanges d'histones. Il a été montré chez la drosophile que TIP60 se lie et acétyle l'histone H2Av préalablement phosphorylé sur la Ser 137 par ATM et ATR, et induit le remplacement de l'histone H2Av non modifiée par cette H2Av phosphorylée et acétylée au site de dommage à l'ADN (Joyce et al. 2011; Kusch et al. 2004).

## 2. Recrutement d'autres protéines sur la chromatine endommagée

D'autres protéines modifiant la structure de la chromatine sont recrutées sur le site du dommage à l'ADN. INO80 et SWR1 sont des complexes protéiques d'environ 15 sous-unités qui ont un rôle de remodelage de la chromatine. Ces complexes sont conservés chez l'humain, la levure et la drosophile, à l'exception de SWR1 qui n'est composé que d'une protéine appelée Domino chez la drosophile (Börner and Becker 2016). INO80 est un complexe possédant une activité hélicase 3'-5' et remodèle la chromatine en retirant

les nucléosomes de l'ADN. SWR1 a pour rôle d'incorporer le variant d'histone H2AZ au niveau du site de lésion de l'ADN, ce qui a pour effet d'ouvrir la chromatine afin de faciliter les réactions d'acétylation et d'ubiquitination d'autres histones (Shen et al. 2000; Mizuguchi et al. 2004). Ces deux complexes contiennent la même sous-unité de reconnaissance de  $\gamma$ H2AX, appelée BAF53 chez les mammifères, qui permet le recrutement de ces complexes sur le site de dommage à l'ADN.

## C. La réparation des cassures double-brin

Il existe 2 voies de signalisation principales permettant la réparation des DSB : la réparation par jonction des extrémités non-homologues (Non Homologous End Joining ou NHEJ) qui ligature directement les deux extrémités de la cassure et la recombinaison homologue (Homologous Recombination ou HR) qui utilise une séquence homologue pour recopier la région perdue lors de la cassure (Revue : Shrivastav, De Haro, and Nickoloff 2008). Le facteur principal influençant le choix de la voie de signalisation est le stade du cycle cellulaire dans lequel se trouve la cellule au moment du DSB (A Kakarougkas and Jeggo 2014). Comme la HR requiert une chromatide sœur homologue, elle ne peut avoir lieu qu'en phase S et G2, alors que les cellules en G1 réparent les DSB par NHEJ. La HR est prédominante en phase S et G2 chez la levure et la drosophile, alors que chez l'humain, la NHEJ reste la voie majeure de réparation même en G2 (A Kakarougkas and Jeggo 2014).

### 1. La jonction des extrémités non-homologues (NHEJ)

La NHEJ est initiée par la reconnaissance des DSB par le complexe de liaison à l'ADN Ku70/80. Ce complexe se lie aux extrémités d'ADN cassé et induit le recrutement d'autres protéines, permettant la ligation des extrémités cassées. La majorité des DSB ont des extrémités incompatibles pour la ligation, et un processus de resection est nécessaire avant la ligation (Revue : Huertas 2010).

L'une des protéines recrutées par le complexe Ku est la sérine/thréonine kinase DNA-PKcs (DNA-dependant protein kinase catalytic subunit). Les cibles de cette kinase sont H2AX, l'endonucléase Artemis, XRCC4 (X-ray cross complementing protein 4), XLF

(XRCC4-like factor) et la DNA ligase IV (Revue : Meek, Dang, and Lees-Miller 2008). La phosphorylation de ces protéines permet le maintien des deux brins d'ADN cassés ensemble et la ligation des extrémités (Mari et al. 2006) (Figure 12).

De plus, DNA-PKcs collabore avec les kinases ATM et ATR pour phosphoryler des facteurs essentiels au DNA damage checkpoint.

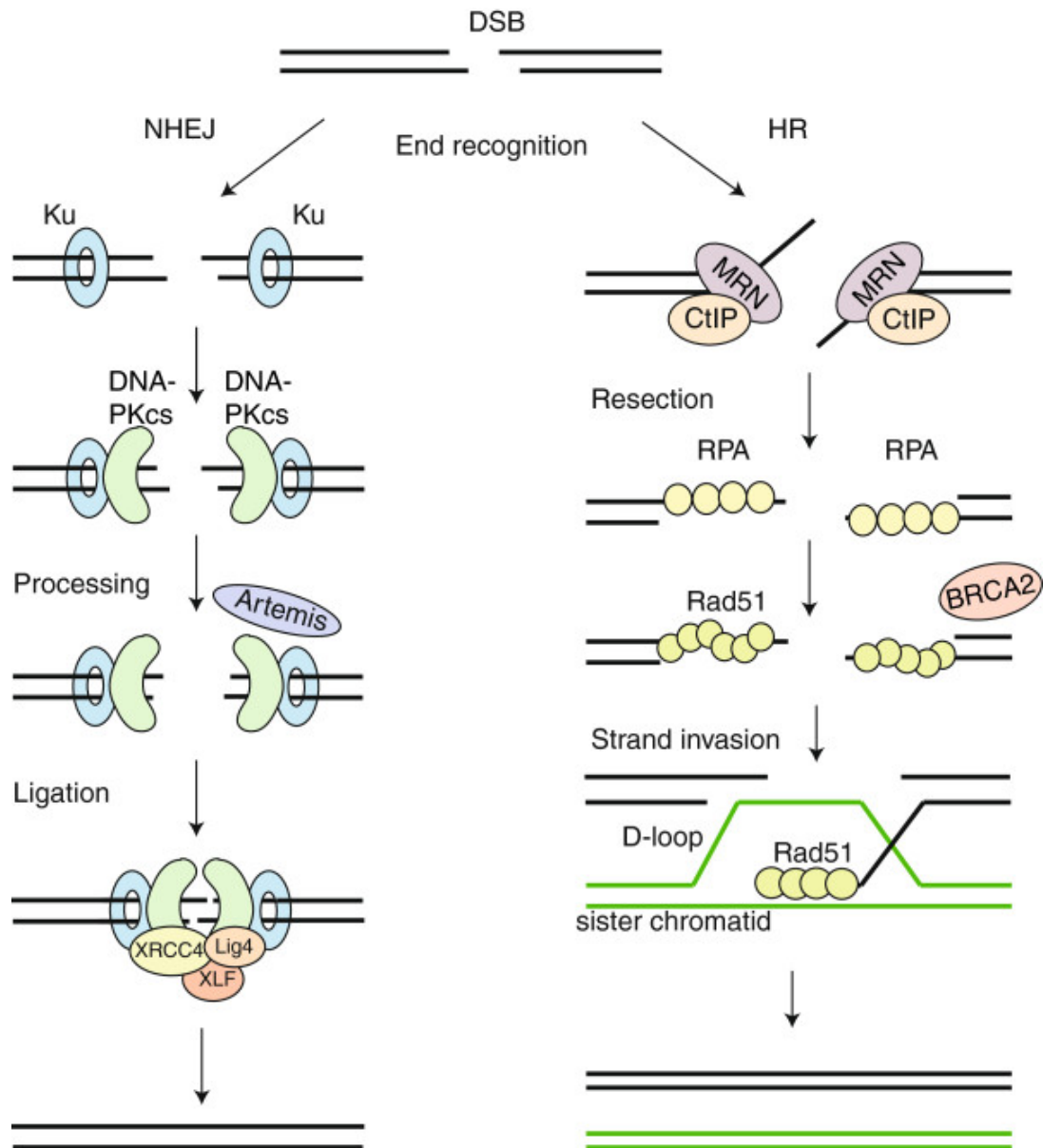
La NHEJ permet la réparation de l'ADN, mais cette réparation entraîne une modification du génome.

## 2. La recombinaison homologue (HR)

La HR est initiée par le complexe MRN, qui maintient les deux fragments d'ADN cassé ensemble (de Jager et al. 2001) et qui recrute la nucléase CtIP (CtBP-interacting protein) (Takeda et al. 2007). CtIP collabore avec EXO1 (exonuclease 1) dans un processus de résection pour générer des intermédiaires d'ADN simple brin (ssDNA ou single strand DNA) (Sartori et al. 2007; Limbo et al. 2007). Le processus de résection est inhibé par 53BP1 et RIF1 (RAP1-interacting factor) pour favoriser la NHEJ (Chapman et al. 2013). Cette inhibition doit être levée par la protéine BRCA1 (Breast Cancer Associated Gene 1) afin de promouvoir la HR (Zimmermann and de Lange 2014, 1). Le recrutement de BRCA1 sur l'ADN est induit par l'ubiquitination de l'histone H2A par les ubiquitine ligases RNF8 et RNF168 qui sont elles même recrutées par MDC1 (Huen et al. 2007).

Les intermédiaires de ssDNA sont premièrement reconnus par la protéine RPA, qui va ensuite être remplacée par Rad51 grâce à un processus dépendant de BRCA2 (Breast Cancer Associated Gene 2) (Pellegrini et al. 2002). Le complexe ssDNA/Rad51 recherche et envahit la séquence homologue sur la chromatide sœur pour former une D-loop. Une ADN polymérase synthétise ensuite la partie manquante du brin d'ADN cassé en utilisant le brin homologue comme matrice, menant à la formation de jonctions de Holliday. Les jonctions de Holliday sont ensuite résolues par l'hélicase BLM (Mus309 chez la drosophile) et la topoisomérase TopoIII $\alpha$  ou par la Resolvase A (X. Li and Heyer 2008). Enfin, les ADN polymérases et les ligases se chargent de compléter les ssDNA restants (Figure 12).





**Figure 12 : HR et NHEJ.** A gauche : la NHEJ commence avec la reconnaissance des extrémités d'ADN par le complexe Ku, qui recrute DNA-PKcs. Lorsque les extrémités sont incompatibles pour la ligation, les nucléases comme Artemis font une résection des extrémités. Le complexe XRCC4-DNA Ligase IV-XLF joint les extrémités. A droite, la HR : le complexe MRN et CtIP commencent la résection de la cassure pour générer des extrémités simple brin d'ADN. Les extrémités simple brin sont premièrement recouvertes par RPA qui est ensuite remplacé par Rad51 avec l'aide de BRCA2. Ces filaments de nucléoprotéines envahissent le brin d'ADN homologue et des ADN polymérases l'utilisent comme matrice pour réparer l'ADN endommagé (Modifié de Brandsma and Gent 2012)

## B. Le checkpoint de dommage à l'ADN (DNA damage checkpoint)

### 1. La mise en place du DNA damage checkpoint

Lors de dommages à l'ADN, la cellule met en place en parallèle des mécanismes de réparation un processus appelé DNA damage Checkpoint qui permet de retarder la progression du cycle cellulaire afin de réparer les lésions de l'ADN. Les voies de blocage du cycle cellulaire sont différentes selon le moment où est généré le dommage à l'ADN.

#### a. DNA damage checkpoint en G1

Lorsque l'ADN est endommagé en G1, ATM et Chk2 stabilisent par phosphorylation le facteur de transcription p53, ce qui active l'expression de nombreux gènes dont le gène de la protéine inhibitrice des CDKs, p21 (Harper et al. 1995). L'expression de p21 induit l'inhibition de CDK2-cycline D et entraîne un arrêt du cycle cellulaire en phase G1. ATM active également par phosphorylation les protéines de la famille des p38-MAPK qui stabilisent les mRNA codant pour p21 et renforcent son expression (Lafarga et al. 2009). Enfin, ATM, Chk2 et les p38-MAPK activent des voies de signalisation qui préviennent le passage en phase S en favorisant la dégradation d'activateurs de CDK2 qui sont la cycline D et la phosphatase CDC25 (Revue : Shaltiel et al. 2015).

#### b. DNA damage checkpoint en S et G2

Une fois que CDK2 est activée, la cellule entre en phase S et la réplication de l'ADN est initiée. A cette étape, le blocage du cycle cellulaire ne peut plus passer par la stabilisation de p53 et l'expression de l'inhibiteur des CDKs p21, car l'activité de CDK2 est requise en phase S. En effet, l'inhibition par p21 de CDK2 pourrait entraîner une deuxième réplication de l'ADN lors de la reprise du cycle cellulaire. A ce stade, p21 doit donc être inhibé et pour ce faire, p21 est ubiquitiné par l'ubiquitine ligase CRL4<sup>Cdt2</sup> présente au niveau des fourches de réplication (Abbas et al. 2008). A ce stade, la

progression du cycle cellulaire est bloquée grâce à Chk1 et Chk2 qui phosphorylent et active Wee1, et favorisent la dégradation de CDC25, ce qui retarde l'activation de CDK1 (voir section "A. L'entrée en mitose est sous le contrôle de CDK1") (Hughes et al. 2013).

Le mécanisme de blocage du cycle cellulaire en G2 est le même qu'en phase S. De plus, l'inhibition des CDKs par p21 est rétablie (Bunz et al. 1998). Enfin, ATM et ATR phosphorylent Bora sur la Thr501 pour induire son ubiquitination par SCF<sup>βTRCP</sup> puis sa dégradation par le protéasome (Qin et al. 2013). La dégradation de Bora empêche l'activation de Polo et contribue à bloquer la cellule en phase G2 (voir section "B. Activation de Polo" p31).

## 2. L'extinction de la DDR

L'extinction du DNA damage checkpoint requiert la suppression de toutes les modifications post-traductionnelles qui ont été mises en place lors de la DDR.

Plusieurs sérines/thréonines phosphatases sont impliquées dans la déphosphorylation des substrats de la DDR et ces phosphatases ont des substrats en commun. Par exemple, PP2A accompagnée de ses sous-unités B55α et B56α, PP4, PP6 et Wip1 déphosphorylent γH2AX, mais agissent à des moments et *via* des mécanismes différents. De même, ATM et Chk2 sont déphosphorylées par PP1, PP2A et Wip1 qui sont régulées par des voies de signalisation différentes (Revue : Shaltiel et al. 2015).

Des enzymes de dé-ubiquitination comme POH1 et BRCC36 sont recrutées sur les chaînes de poly-ubiquitine pour dé-ubiquitiner les histones (Andreas Kakarougkas et al. 2013; Butler et al. 2012; Shao et al. 2009).

La suppression des modifications post-traductionnelles n'est pas la seule voie d'extinction de la DDR. De nombreuses protéines modifiées pendant la DDR sont détruites par le protéasome. Le protéasome est recruté sur le site de dommage à l'ADN, possiblement par les dé-ubiquitine ligases POH1 et UCHL5, et dégrade MDC1, RPA1, Chk2 ou encore des ADN polymérasés de réparation (Galanty et al. 2012; Feng and Chen 2012; Nishi et al. 2014)

La reprise du cycle cellulaire après inactivation de la DDR en G2 suit la même voie que pour une entrée en mitose non perturbée, avec quelques différences notables. La DDR inhibe l'activité des kinases mitotiques CDK1, Polo et Aurora A et induit la dégradation de CDC25A et Bora (Krystyniak et al. 2006; Smits et al. 2000; Qin et al. 2013;

Lock and Ross 1990; Falck et al. 2001). Après un arrêt en G2 induit par la DDR, Polo et ses activateurs Aurora A et Bora sont nécessaires à la reprise du cycle cellulaire, en contribuant à l'activation de cycline B-CDK1 (Lindqvist, Rodríguez-Bravo, and Medema 2009).

En plus de contrôler la réactivation de CDK1, Polo est également impliquée dans l'extinction du signal de la DDR en phosphorylant Chk2 sur de multiples sites, ce qui inhibe Chk2 en empêchant sa dimérisation et son recrutement sur les DSBs (van Vugt et al. 2010). Polo inhibe également Chk1 en induisant l'ubiquitination et la dégradation de la claspin, qui est une protéine permettant de lier Chk1 et ATR (Mailand et al. 2006) et rad53 chez la levure (Edenberg et al. 2014).

### 3. L'adaptation au DNA damage checkpoint

Le DNA damage checkpoint en G2 semble robuste pour induire un arrêt du cycle permanent et la senescence (Krenning et al. 2014), même en fin de phase G2 (Feringa et al. 2016). Cependant, certaines cellules n'ayant pas réparé leur ADN sont capables de reprendre le cycle cellulaire. Ce phénomène, appelé adaptation au checkpoint, a d'abord été découvert chez la levure, puis a été mis en évidence chez le Xénope et dans les cellules de mammifères (Revue : Lupardus and Cimprich 2004; Andreassen et al. 2001). L'adaptation au checkpoint résulte de la phosphorylation des substrats de Polo par son activité basale, même en présence de dommages à l'ADN. En G2, lorsque l'activité de Polo dépasse un certain seuil, la cellule entre en mitose (Liang et al. 2014).

Cependant, l'activité de Polo est nécessaire mais pas suffisante à l'adaptation au checkpoint. D'autres facteurs permettant d'inhiber le DNA damage checkpoint collaborent avec Polo pour induire la reprise du cycle cellulaire, comme la phosphatase Wip1 qui s'accumule pendant l'arrêt du cycle cellulaire de manière p53 dépendante et qui déphosphoryle et inactive plusieurs acteurs du DNA damage checkpoint tels Chk1 et Chk2 (Lu, Nguyen, and Donehower 2005; Lu, Nguyen, and Donehower 2005).

Ce processus permet à une cellule ayant un génome endommagé d'entrer en mitose, ce qui peut engendrer de l'instabilité chromosomique et provoquer la mort cellulaire ou la tumorigénèse.

## 4. Prise en charge des DSBs pendant la mitose

La présence de cassures en mitose induit l'initiation des premières étapes de la DDR suivit d'une inhibition des étapes ultérieures de réparation des dommages (Peterson et al. 2011; Orthwein et al. 2014; Giunta, Belotserkovskaya, and Jackson 2010).

Le complexe MRN et les protéines MDC1 et CtIP sont recrutés sur les DSB en mitose. De plus, ATM et DNA-PKcs sont activées et la phosphorylation de H2Ax au niveau des lésions a lieu.

### a. Inhibition de la HR

La nucléase CtIP et le complexe MRN induisent la résection de l'ADN et RPA est recrutée sur les ssDNA ainsi générés. Cependant, cette résection ne mène pas à l'activation de ATR ou au recrutement de RAD51. CDK1 favorise la résection en phosphorylant CtIP et prévient également le recrutement de RAD51 sur les ssDNA (Peterson et al. 2011). L'absence de RAD51 sur les ssDNA empêche la réparation de l'ADN par la voie de la HR. (Orthwein et al. 2014).

### b. Inhibition de la NHEJ

Des études semblent suggérer que 53BP1 est inhibé par CDK1 et Polo en mitose. CDK1 phosphoryle 53BP1 *in vitro* et ceci favorise l'interaction et la phosphorylation de 53BP1 par Polo. Cette phosphorylation inhiberait l'activité de 53BP1 et son recrutement sur la chromatine de cellules en mitose (Benada et al. 2015). Une étude a révélé que la surexpression de 53BP1 en mitose induit des fusions de télomères. Ces résultats suggèrent que les effecteurs qui prennent en charge la réparation de l'ADN doivent être par défaut inhiber en mitose pour empêcher les séquences télomériques d'être confondues avec des DSB et réparées en conséquence (Orthwein et al. 2014).

Polo et CDK1 phosphorylent également XRCC4, dans le but d'inhiber son recrutement sur les DSBs et en conséquence, inhiber la réparation de l'ADN par NHEJ (Terasawa, Shinohara, and Shinohara 2014).

### c. Inhibition du DNA damage checkpoint

La présence du DNA damage checkpoint en mitose est controversée. Il a été montré que Polo joue un rôle important dans l'inhibition du DNA damage checkpoint. Polo phosphoryle Chk2 sur de multiples sites, ce qui inhibe Chk2 en empêchant sa dimérisation et son recrutement sur les DSBs (van Vugt et al. 2010). Polo inhibe également Chk1 en induisant *via* l'ubiquitine ligase SCF<sup>βTRCP</sup> la dégradation de la claspin, qui est une protéine permettant de lier Chk1 et ATR (Mailand et al. 2006). Globalement, l'inhibition de Chk1 et Chk2 par Polo empêche la mise en place du DNA damage checkpoint et préserve l'activité de CDK1 nécessaire au déroulement de la mitose.

Cependant, d'autres études montrent que Polo est inhibée en mitose par la déphosphorylation de la Thr210 au niveau de la T-loop de son domaine kinase par PP2A, *via* une voie de signalisation impliquant ATM et Chk1. L'inhibition de Polo provoque une sortie de la mitose sans passer par les étapes de l'anaphase et de la cytokinèse, générant une cellule en phase de G1 avec deux fois plus de matériel génétique (4N). Ces cellules répliquent une nouvelle fois leur ADN, passant à une cellule ayant quatre fois plus de matériel génétique (8N), avant de rentrer en apoptose (H.-J. Lee, Hwang, and Jang 2010; Jang et al. 2007; Revue : Hyun, Hwan, and Jang 2014).

Il a également été montré que chez la drosophile, la présence de DSB en mitose induit un délai de la transition métaphase/anaphase dépendant de Chk1 (Royou, Macias, and Sullivan 2005).



# Chapitre 4 : Problématiques et objectifs de thèses

La présence pendant la mitose de DSBs non réparées implique qu'un ou plusieurs chromosomes sont fragmentés. Les fragments contenant les centromères sont appelés fragments centriques et les fragments sans centromères sont appelés fragments acentriques. Ces fragments acentriques sont problématiques pour la cellule, car ils ne possèdent pas de kinétochores et ne peuvent donc pas se lier aux microtubules du fuseau mitotique pour être ségrégués durant l'anaphase. Il a cependant été montré chez la levure que ces fragments acentriques migraient correctement vers les pôles lors de l'anaphase (Galgoczy and Toczyski 2001; Malkova, Ivanov, and Haber 1996; Sandell and Zakian 1993).

## Résultats préliminaires (Royou et al. 2010)

Notre équipe a montré que la ségrégation des chromosomes acentriques est facilitée par une structure appelée « tether » qui est constituée d'un filament d'ADN recouvert de protéines mitotiques. Ce tether connecte le fragment acentrique à la partie centrique et permet la ségrégation correcte de ce fragment. Afin d'étudier ce tether, des DSBs ont été générés par expression de l'endonucléase I-CreI qui reconnaît une séquence de 20 nucléotides dans les répétitions rDNA (ADN ribosomique) localisées dans la chromatine péri-centromérique des chromosomes sexuels de la drosophile. En phases G2 et M, la cellule possède 2 chromosomes sexuels dupliqués équivalents à 4 chromatides sœurs, cette méthode génère donc 4 fragments acentriques. Cette méthode permet de créer des fragments de chromosomes acentriques dans 80% des cellules plusieurs heures après induction de l'expression de I-CreI. La génération de fragments acentriques dans toutes les cellules de larves de drosophile au troisième stade larvaire ne diminue pas la viabilité des individus. De plus, les observations de la dynamique des fragments acentriques dans les neuroblastes de Drosophile par vidéomicroscopie ont révélé que dans une grande majorité des cellules (73%), les fragments acentriques ségrégent de façon égale dans chaque cellule fille (2 fragments acentriques par cellule fille). Ces



résultats montrent que la formation du tether est un mécanisme robuste permettant de ségréger les fragments acentriques avec leur partenaire centrique et ainsi de préserver le génome de la plupart des cellules filles et maintenir la viabilité des individus.

Le fonctionnement correct de ce mécanisme requiert le recrutement sur le « tether » des protéines BubR1, Polo, Aurora B et INCENP. La génération de DSBs par I-CreI provoque le recrutement de ces protéines sur le tether au cours de la mitose. Cependant, la protéine centromérique Cid n'est pas recrutée sur les cassures de chromosome, suggérant que la ségrégation des chromosomes acentriques ne repose pas sur la formation d'un néo-centromère.

Il a été montré précédemment que l'induction de I-CreI entraîne un retard de l'entrée en anaphase (Royou et al. 2005). Afin de tester la possibilité que le délai de l'anaphase soit induit par le SAC, des neuroblastes homozygotes pour une mutation hypomorphe de BubR1 et exprimant une copie de BubR1 mutée sur les KEN Box, ont été observés après induction de I-CreI. La mutation des KEN Box altère les fonctions du SAC. Il a été montré que l'anaphase était toujours retardée, même en l'absence des fonctions du SAC de BubR1. De plus, Mad2, une autre protéine du SAC, ne localise pas sur les cassures de chromosome.

En revanche, l'atténuation des fonctions de BubR1 (mutant hypomorphe ou mutant KEN Box) ou Polo (mutant hypomorphe) provoque des défauts de ségrégation des chromosomes acentriques, une augmentation de la fréquence des fragments acentriques non reliés à la partie centrique ainsi qu'une forte diminution du taux de survie après induction de l'expression de I-CreI.

## Objectifs de thèse

Les protéines BubR1 et Polo sont importantes pour assurer la ségrégation des fragments de chromosomes acentriques, cependant le mécanisme moléculaire permettant cette fonction n'est pas encore connu. L'objectif de cette thèse a été d'identifier le mode de recrutement, les interactions et les fonctions de BubR1 et Polo au niveau des cassures en mitose et d'identifier de nouveaux acteurs impliqués dans la ségrégation des chromosomes acentriques.

# Résultats



# I. Article 1 : Bub3–BubR1-dependent sequestration of Cdc20<sup>Fizzy</sup> at DNA breaks facilitates the correct segregation of broken chromosomes

**Résumé :** La transmission correcte du génome requiert l'attachement correct des chromosomes aux microtubules du fuseau mitotique par l'ensemble centromères/kinétochores. Nous avons identifié récemment un mécanisme permettant la ségrégation correcte des chromatides acentriques cassées, impliquant un lien d'ADN (le « tether ») qui relie les fragments cassés acentriques et centriques. BubR1, un élément du point de contrôle de l'assemblage du fuseau mitotique (SAC), s'accumule sur le tether et facilite la ségrégation correcte des chromatides cassées. Cependant, la régulation et la fonction de BubR1 au tether restaient inconnues. Ici, nous montrons que le domaine de liaison à Bub3 (Bub3-BD) est requis pour la localisation de BubR1 sur le tether. En effet, Bub3 s'associe avec le tether et médie le recrutement de BubR1 au tether ainsi que la ségrégation correcte des chromatides cassées. De plus, Cdc20, une sous-unité clé de l'APC/C, une E3 ubiquitine ligase responsable de l'entrée en anaphase, s'associe au tether de manière dépendante de la KEN box de BubR1, ce qui suggère que le complexe Bub3/BubR1 séquestre Cdc20 sur le tether inhibant ainsi localement l'APC/C. En effet, un substrat synthétique pour l'activité de l'APC/C est dégradé plus tardivement sur le tether pendant l'anaphase précoce et cette inhibition locale de dégradation dépend de BubR1. Nous proposons que Bub3 permet le recrutement de BubR1 aux chromosomes cassés, qui, à son tour, inhibe l'APC/C localement en séquestrant Cdc20, préservant ainsi l'intégrité du tether et permettant la ségrégation correcte des chromatides cassées.



# Bub3–BubR1-dependent sequestration of Cdc20<sup>Fizzy</sup> at DNA breaks facilitates the correct segregation of broken chromosomes

Nicolas Derive,<sup>1,2\*</sup> Cedric Landmann,<sup>1,2\*</sup> Emilie Montebault,<sup>1,2</sup> Marie-Charlotte Claverie,<sup>1,2</sup> Priscillia Pierre-Elies,<sup>1,2</sup> Damien Goutte-Gattat,<sup>1,2</sup> Nabila Founounou,<sup>1,2</sup> Derek McCusker,<sup>1,2</sup> and Anne Royou<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Université de Bordeaux and <sup>2</sup>Centre National de la Recherche Scientifique, Institut Européen de Chimie et Biologie, Institut de Biochimie et Génétique Cellulaires, Unité Mixte de Recherche 5095, 33607 Pessac, France

The presence of DNA double-strand breaks during mitosis is particularly challenging for the cell, as it produces broken chromosomes lacking a centromere. This situation can cause genomic instability resulting from improper segregation of the broken fragments into daughter cells. We recently uncovered a process by which broken chromosomes are faithfully transmitted via the BubR1-dependent tethering of the two broken chromosome ends. However, the mechanisms underlying BubR1 recruitment and function on broken chromosomes were largely unknown. We show that BubR1 requires interaction with Bub3 to localize on the broken chromosome fragments and to mediate their proper segregation. We also find that Cdc20, a cofactor of the E3 ubiquitin ligase anaphase-promoting complex/cyclosome (APC/C), accumulates on DNA breaks in a BubR1 KEN box-dependent manner. A biosensor for APC/C activity demonstrates a BubR1-dependent local inhibition of APC/C around the segregating broken chromosome. We therefore propose that the Bub3–BubR1 complex on broken DNA inhibits the APC/C locally via the sequestration of Cdc20, thus promoting proper transmission of broken chromosomes.

## Introduction

Cells are constantly exposed to aggressions that alter their genome during their life cycle. To sustain life, mechanisms have evolved to repair DNA lesions and preserve the genome. The presence of DNA damage, such as double-strand breaks (DSBs), during interphase triggers a conserved DNA damage response (DDR) that promotes DNA repair and delays mitotic entry via activation of the DNA damage checkpoint (Melo and Toczyski, 2002; Jackson and Bartek, 2009). Less is known about how mitotic cells process DSBs. However, given the high frequency of cell division in developing organisms and in adult humans, the occurrence of DSBs in mitosis is likely to be significant. Studies in various model organisms have shown that DSBs in mitosis delay anaphase onset via the activation of the DNA damage and/or spindle assembly checkpoints (SACs) depending on the extent of damage (Melo et al., 2001; Mikhailov et al., 2002; Royou et al., 2005; Choi and Lee, 2008; Kim and Burke, 2008; Dotiwala et al., 2010; Jessulat et al., 2015). Moreover, recent studies in vertebrate mitotic cells found that the presence of DSBs triggers the initiation of the DDR, followed by an inhibition

of the downstream pathways that repair the damage, either by nonhomologous end joining (NHEJ) or homology-targeted repair (Mari et al., 2006; Giunta et al., 2010; Gomez-Godinez et al., 2010; Peterson et al., 2011; Orthwein et al., 2014; Silva et al., 2014; Benada et al., 2015). These studies further show that a full DDR is reactivated upon G1 entry (Giunta et al., 2010; Orthwein et al., 2014). Thus, DSBs are detected in mitosis and marked to facilitate their repair after mitotic exit. However, it remains unclear how the cell segregates the two broken chromosome fragments, the centric and acentric fragments resulting from DSB generation. In yeast, chromosome fragments with DSBs remain apposed throughout mitosis, leading to the formation of aneuploid daughter cells (Melo et al., 2001; Kaye et al., 2004). In *Drosophila melanogaster*, the centric and acentric chromosome fragments generated by the endonuclease I-CreI, which creates DSBs at ribosomal DNA repeats, remain attached via a DNA thread that we refer to as a “tether” (Royou et al., 2010). These tethers facilitate the faithful segregation of sister chromatids, thus preventing aneuploidy. The kinases BubR1, Polo, and Aurora B accumulate on these tethers throughout mitosis. Attenuation of BubR1 or Polo function provoke severe

\*N. Derive and C. Landmann contributed equally to this paper.

Correspondence to Anne Royou: a.royou@iecb.u-bordeaux.fr

Abbreviations used in this paper: APC/C, anaphase-promoting complex/cyclosome; DDR, DNA damage response; DSB, double-strand break; emCCD, electron-multiplying charge-coupled device; HS, heat shock; KARD, kinetochore-associated regulatory domain; NHEJ, nonhomologous end joining; SAC, spindle assembly checkpoint; WT, wild type.

© 2015 Derive et al. This article is distributed under the terms of an Attribution–Noncommercial–Share Alike–No Mirror Sites license for the first six months after the publication date (see <http://www.rupress.org/terms>). After six months it is available under a Creative Commons License (Attribution–Noncommercial–Share Alike 3.0 Unported license, as described at <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/3.0/>).

Supplemental Material can be found at:  
<http://jcb.rupress.org/content/suppl/2015/11/04/jcb.201504059.DC1.html>

defects in broken chromatid segregation and induce synthetic lethality in combination with I-CreI expression. BubR1 and Polo may facilitate the proper segregation of broken chromatids by maintaining the integrity of the tether, providing an opportunity to repair the damage in the next cell cycle.

BubR1 localizes to unattached kinetochores and plays a conserved role in the SAC that delays anaphase onset until all chromosomes are properly attached to the spindle microtubules (Karess et al., 2013). Anaphase is triggered by the anaphase-promoting complex/cyclosome (APC/C), an E3 ubiquitin ligase that targets Securin and Cyclin B for proteolysis, thereby allowing sister chromatid separation resulting from separate-mediated cleavage of the cohesin complex and mitotic exit via dephosphorylation of Cyclin B/CDK1 substrates. In the presence of unattached kinetochores, BubR1, Bub3, and Mad2 form the mitotic checkpoint complex that sequesters Cdc20, a key subunit of the APC/C, thereby inhibiting its activity globally (Foley and Kapoor, 2013). BubR1 also plays a role in promoting the stabilization of kinetochore–microtubule attachments (Rahmani et al., 2009; Elowe et al., 2010; Karess et al., 2013). We have recently identified a novel localization and function for BubR1 on DSBs in mitosis (Royou et al., 2010). However, the mechanisms that promote BubR1 localization on broken chromatids and its molecular function in facilitating their proper segregation have yet to be elucidated.

Here, we show that BubR1 requires its association with Bub3 to localize on laser-induced DNA breaks and I-CreI-induced tethers in mitosis, and that both proteins are required for the efficient segregation of broken chromatids. In addition, the Bub3–BubR1 complex sequesters Cdc20 on DSBs throughout mitosis via the BubR1 KEN box, thereby inducing a local inhibition of the APC/C at the site of DSBs until late anaphase. A BubR1 KEN box mutant fails to sequester Cdc20 and to locally inhibit the APC/C on DNA breaks. As a result, these mutant cells exhibit severe defects in broken chromatid segregation. Reciprocally, a Cdc20 mutant that perturbs its interaction with the BubR1 KEN box fails to localize on DNA breaks and compromises the faithful segregation of broken chromatids.

## Results

### The Bub3-binding domain of BubR1 is necessary and sufficient for BubR1 localization on the kinetochore and tether

*Drosophila* BubR1 contains four large domains separated by unstructured regions. The N-terminal domain is well conserved and contains a KEN box (lysine–glutamate–asparagine) and tetratricopeptide repeats required for BubR1 interaction with Cdc20 and its spindle checkpoint activity (Burton and Solomon, 2007; King et al., 2007; Sczaniecka et al., 2008; Rahmani et al., 2009). The second domain, called the Bub3-binding domain (Bub3-BD or GLEBS domain), is conserved and promotes BubR1 recruitment to the kinetochore via its interaction with Bub3 in yeast and vertebrates (Wang et al., 2001; Chen, 2002; Larsen et al., 2007). This domain also contains a kinetochore-associated regulatory domain (KARD) identified in vertebrate BubR1, whose phosphorylation promotes BubR1 association with the PP2A-B56 $\alpha$  phosphatase subunit at the kinetochore (Suijkerbuijk et al., 2012; Kruse et al., 2013). Using a secondary structure prediction algorithm (globprot; Linding et al., 2003), we identified a third structured domain with poor

conservation (named 3). Finally, the C terminus contains the kinase domain, which is known to play a role in stabilizing kinetochore–microtubule attachments (Rahmani et al., 2009).

To determine which domain of BubR1 is required for its localization on the tether, the DNA thread that links the centric and acentric chromosome fragments, we cloned a series of truncated BubR1 constructs tagged at their N terminus with GFP under the control of a ubiquitous promoter. We cloned 11 BubR1 constructs, shown schematically in Fig. 1 A. The expression of the GFP::BubR1 fusion proteins in adult flies was confirmed by Western blotting (Fig. 1 B). The full-length fusion rescued the lethality of the *bubR1*<sup>1</sup> null mutant.

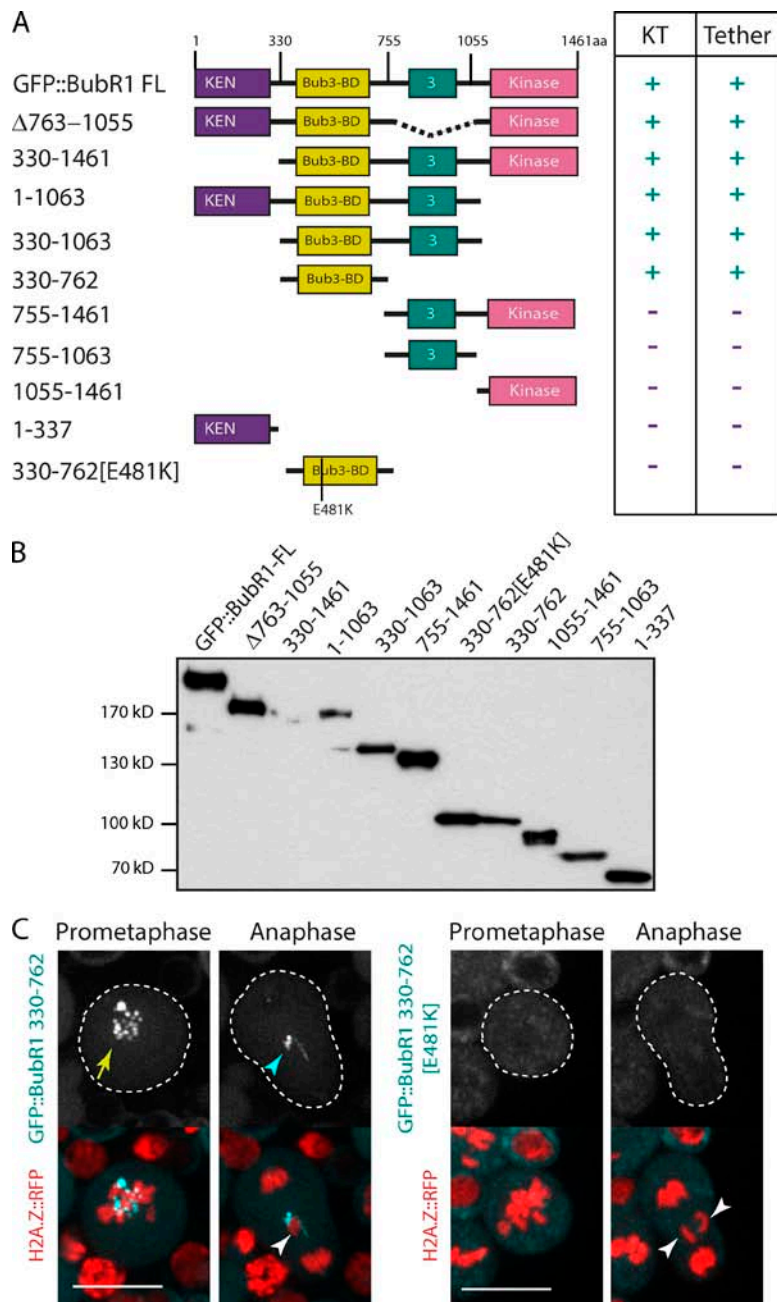
Neuroblasts from female larvae expressing the truncated GFP::BubR1 constructs and H2A.Z::RFP, a marker of chromosomes, were imaged by time-lapse microscopy after I-CreI induction. I-CreI creates DSBs specifically at one location in the X chromosomes, generating two distinct fragments, a short fragment containing the centromere and a long acentric fragment (Rong et al., 2002; Royou et al., 2010). As expected, full-length GFP::BubR1 signal accumulated on kinetochores at prometaphase and faded during anaphase (Fig. S1). Moreover, as previously observed with a different GFP::BubR1 transgene and with anti-BubR1 antibodies, the fluorescent signal remained on the tether of the lagging I-CreI-induced broken chromatids throughout anaphase (Fig. S1; Royou et al., 2010). The localization of the truncated BubR1 fusions on the kinetochore and tether are summarized in Fig. 1 A. We found that amino acids 330–762, containing the Bub3-BD, were necessary and sufficient for BubR1 localization on both the kinetochore and the tether (Fig. 1, A and C; Fig. S1; and Video 1).

### Glutamate 481 in the Bub3-BD is required for BubR1 recruitment on the kinetochore and the tether

Glutamate (E) 406 in the Bub3-BD of murine BubR1 has been identified as a key residue for BubR1 interaction with Bub3 (Harris et al., 2005). E481 in the BubR1 *Drosophila* sequence is predicted by Clustal alignment to be the equivalent of E406. To determine whether the BubR1 interaction with Bub3 is required for BubR1 localization on the tether, we mutated E481 to lysine (K) in the Bub3-BD construct (330–762 [E481K]) and monitored its dynamics during mitosis (Fig. 1 A). We found that 330–762 [E481K] is expressed in the adult fly (Fig. 1 B), but localized neither on the kinetochore nor on the tether in mitotic cells (Fig. 1 C and Video 2). These data confirmed that E481 is a key conserved residue essential for BubR1 localization on the kinetochore and support the idea that Bub3 mediates BubR1 localization on the kinetochore and tether.

### The complex Bub3-BubR1 localizes on I-CreI- and laser-induced DNA breaks

Bub3 interacts with BubR1 at the kinetochore (Taylor et al., 1998; Larsen et al., 2007). To assess the role of Bub3 in mitotic cells with broken chromosomes, we investigated the dynamics of Bub3 in dividing neuroblasts after I-CreI expression. We generated transgenic flies expressing RFP::Bub3 under the control of the Bub3 promoter. The fusion protein rescued the lethality associated with the *bub3*<sup>1</sup> mutant allele, consistent with it being functional. We found that RFP::Bub3 localized on the kinetochore during prometaphase and disappeared from the kinetochore progressively during anaphase, in agreement with previous findings using anti-Bub3 antibodies (Fig. 2 A; Basu



**Figure 1. The Bub3-BD of BubR1 is necessary and sufficient for BubR1 localization on the tether.** (A) Scheme of BubR1 full-length (FL) domains identified with a secondary structural prediction algorithm (globprot), and the BubR1 truncated versions along with their localization (+) or not (-) on the kinetochore (KT) or tether. The numbers correspond to the position of the first and last amino acid of the BubR1 truncation construct. The 330–762 [E481K] construct contains a substitution of E481 by K. The BubR1 constructs are fused with GFP on their N terminus. (B) Western blot of the different GFP::BubR1 constructs from transgenic adult flies. (C) Images of live neuroblasts expressing I-CreI and labeled with H2A.Z::RFP and the indicated GFP::BubR1 constructs (also see Video 1 and Video 2). The kinetochore and tether localization of the GFP::BubR1 constructs are indicated with a yellow arrow and a cyan arrowhead. The white arrowheads point to the I-CreI-induced acentric chromatids. The cells are delineated with white dotted lines. Bars, 10  $\mu$ m.

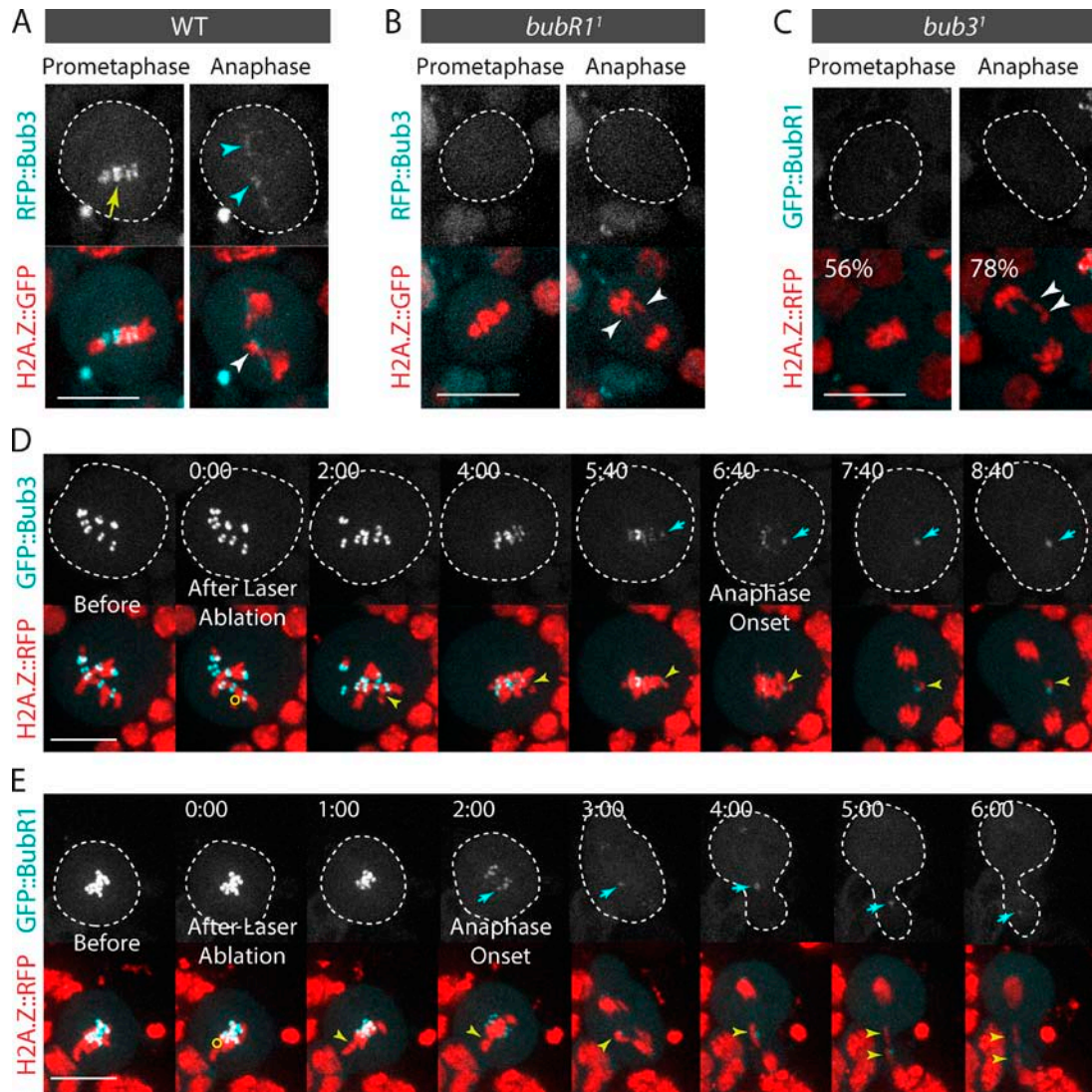
et al., 1998). However, in I-CreI-expressing cells, RFP::Bub3 signal lingered on the lagging broken chromatids throughout anaphase. Like BubR1, the signal disappeared at telophase (Fig. 2 A and Video 3). Similar results were obtained using a GFP::Bub3 construct (unpublished data).

To verify that Bub3 and BubR1 recruitment to DSBs is a result of DNA damage, and not specific to I-CreI-induced damage on ribosomal DNA repeats, we examined the dynamics of GFP::Bub3 and GFP::BubR1 after surgical damage of a single chromosome with a 355-nm pulsed laser. Bub3 and BubR1 signal appeared on DNA damage 2–5 min after laser ablation (Fig. 2, D and E; and Video 4).

Next, we tested the dependency relationship between BubR1 and Bub3 for their localization on DNA breaks. First, we analyzed the localization of RFP::Bub3 in *bubR1*<sup>1</sup> null mutant neuroblasts after I-CreI expression. RFP::Bub3 signal was

not detected on the kinetochore in any of the *bubR1* mutant cells monitored, consistent with immunostaining data using anti-Bub3 antibodies (Basu et al., 1998). In addition, we found no accumulation of RFP::Bub3 near the broken chromatids during anaphase, indicating that Bub3 requires BubR1 to accumulate on the tether (Fig. 2 B). Next, we monitored the dynamics of GFP::BubR1 in a *bub3*<sup>1</sup> mutant. The *bub3*<sup>1</sup> allele carries a point mutation in the coding region, resulting in lethality at the pupal stage (Lopes et al., 2005). In 46% of *bub3*<sup>1</sup> mutant cells, the Bub3 mutant protein failed to localize on the kinetochore (Lopes et al., 2005). Indeed, GFP::BubR1 did not localize on the kinetochore in half of *bub3*<sup>1</sup> mutant cells (Fig. 2 C). In addition, GFP::BubR1 failed to localize on the tether in the majority of *bub3*<sup>1</sup> mutant cells (Fig. 2 C). Collectively, these results indicate that coassociation of BubR1 and Bub3 is required for their robust localization on the kinetochore and tether.





**Figure 2. Bub3 and BubR1 localize on I-CreI- and laser-induced DNA breaks.** (A) Bub3 localizes on the I-CreI-induced tether (also see Video 3). Time-lapse images of WT neuroblasts expressing H2A.Z::GFP and RFP::Bub3 after I-CreI induction. The yellow arrow and cyan arrowheads indicate the localization of RFP::Bub3 on kinetochores and tethers. (B) Bub3 does not localize to the kinetochore or the tether in *bubR1*<sup>1</sup> mutants. Time-lapse images of *bubR1*<sup>1</sup> mutant neuroblasts expressing H2A.Z::GFP and RFP::Bub3 after I-CreI induction. (C) BubR1 does not localize to the kinetochore or the tether in 56% and 78% of *bub3*<sup>1</sup> mutant cells ( $n = 9$ ). Time-lapse images of *bub3*<sup>1</sup> mutant neuroblasts expressing H2A.Z::RFP and GFP::BubR1 after I-CreI induction. The white arrowheads point to the I-CreI-induced acentric chromatids. (D and E) Bub3 (D) and BubR1 (E) localize on laser-induced DNA damage during mitosis. Time-lapse images of neuroblasts expressing H2A.Z::RFP and GFP::Bub3, or GFP::BubR1, before and after laser ablation (also see Video 4). The yellow circles correspond to the zones of laser ablation. The cyan arrows point to the accumulation of Bub3 or BubR1 at the site of the chromosome damage. The yellow arrowheads indicate the laser-induced damage. Time (given in minutes/seconds) 0:00 corresponds to the first acquisition immediately after laser ablation. The cells are delineated with dotted lines. Bars, 10  $\mu$ m.

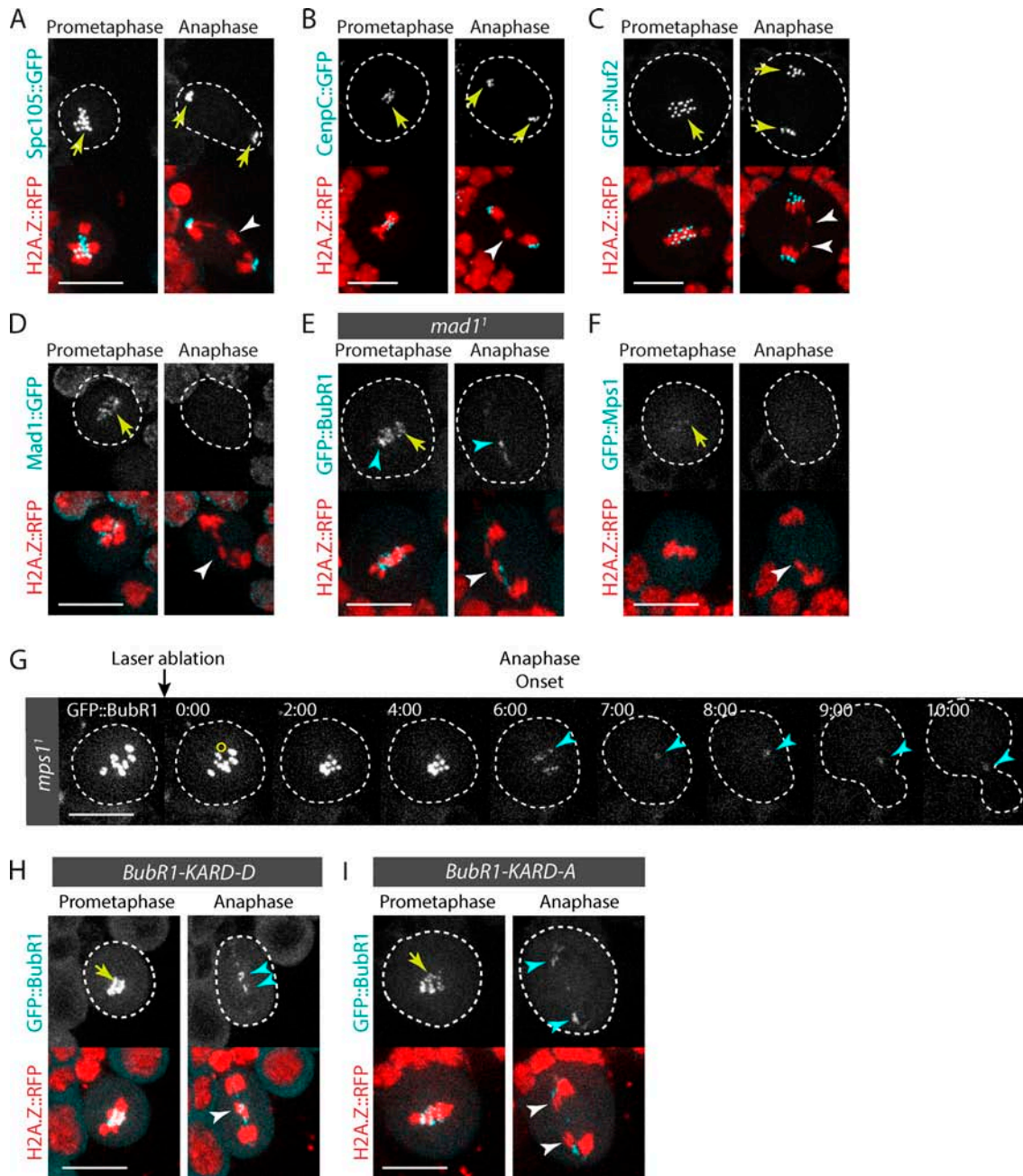
### DNA breaks do not induce neokinetochore formation

It was recently shown that human KNL1 (also known as Spc105, Spc7, and Blinkin), a component of the core kinetochore KNL1–Mis12–Ndc80 (KMN) network, interacts directly with BubR1 and controls the localization of BubR1 and Bub3 on the kinetochore (Kiyomitsu et al., 2007, 2011; D’Arcy et al., 2010; Bolanos-Garcia et al., 2011). Although *Drosophila* Spc105 is dispensable for BubR1 recruitment to the kinetochore (Schittenhelm et al., 2009), we tested the idea that it might promote BubR1 and Bub3 association with the tether. Thus, we monitored the dynamics of Spc105::GFP in mitotic cells with broken chromosomes. Spc105::GFP localized to the kinetochore until late telophase (Fig. 3 A; Schittenhelm et al.,

2009). However, no signal was detected near the lagging broken chromatids, suggesting that Spc105 is not part of the upstream pathway that recruits BubR1 and Bub3 to the tether (Fig. 3 A).

Next, we assessed the dynamics of GFP::Nuf2, a component of the KMN network, and CenPc::GFP in mitotic cells with DSBs. We found that they exclusively localized to the kinetochore throughout mitosis (Fig. 3, B and C; Schittenhelm et al., 2007). These results indicate that the tether does not serve as a platform for the assembly of a neokinetochore. Consistent with this idea, Cid, the H3 histone variant that specifically associates with centromeric DNA and is essential for kinetochore assembly and function, does not localize on the tether (Royou et al., 2010).

Next, we tested the localization of other proteins known to be involved in the Bub3–BubR1-dependent SAC response.



**Figure 3. DNA breaks do not induce neokinetochore formation.** (A–D and F) Time-lapse images of neuroblasts expressing H2A.Z::RFP and Spc105::GFP (A), CenpC::GFP (B), GFP::Nuf2 (C), Mad1::GFP (D), and GFP::Mps1 (F) after I-Cre expression. The white arrowheads point to the I-Cre-induced acentric chromatids. Yellow arrows indicate the localization of the GFP-labeled proteins at the kinetochore. (E) Mad1 is not required for BubR1 localization on broken chromatids. Time-lapse images of a *mad1*<sup>1</sup> mutant neuroblast expressing I-Cre and labeled with H2A.Z::RFP and GFP::BubR1. The white arrowhead indicates I-Cre-induced acentric chromatids. The yellow arrow and cyan arrowheads indicate the localization of GFP::BubR1 at the kinetochore and tether. (G) Mps1 is not required for BubR1 localization on broken chromatids. Time-lapse images of *mps1*<sup>1</sup> mutant neuroblast labeled with GFP::BubR1 before and after laser ablation. The yellow circle corresponds to the zone of laser ablation. The cyan arrowheads indicate the appearance of GFP::BubR1 at the site of chromosome damage. Time (given in minutes/seconds) 0:00 corresponds to the first acquisition immediately after laser ablation. (H and I) BubR1 localization on DNA breaks does not require Polo-dependent phosphorylation of the BubR1 KARD motif. Time-lapse images of neuroblasts expressing I-Cre labeled with H2A.Z::RFP. The neuroblasts express either the GFP::BubR1-KARD-D mutant, where the putative Polo-dependent phosphorylation sites in the KARD motif are replaced by aspartate (H), or GFP::BubR1-KARD-A, where the same residues are mutated to alanine (I). The white arrowheads indicate the I-Cre-induced acentric chromatids. Yellow arrows and cyan arrowheads point to the localization of GFP::BubR1-KARD-D and GFP::BubR1-KARD-A on the kinetochore and tether. Cells are delineated with white dotted lines. Bars, 10  $\mu$ m.

We first monitored the localization of Mad1::GFP on broken chromosomes. Mad1 has a conserved SAC function on the kinetochore. It recruits Mad2, which exists in two conformations: open (O-Mad2) or closed (C-Mad2). The complex Mad1–C-Mad2 promotes O-Mad2 to C-Mad2 conversion. C-Mad2

then binds Cdc20, BubR1, and Bub3, forming the mitotic checkpoint complex, a diffusible APC/C inhibitory complex (Foley and Kapoor, 2013). We found that Mad1::GFP accumulated on the kinetochore during prometaphase and disappeared from the kinetochore at anaphase onset (Fig. 3 D; Emre et al., 2011). In

agreement with our previous findings with GFP::Mad2 (Royou et al., 2010), no Mad1::GFP signal was detected near the lagging broken chromatids during anaphase (Fig. 3 D). Consistently, BubR1 localization on the tether did not depend on Mad1 (Fig. 3 E). These data, and the fact that *mad2* mutants are not sensitive to I-CreI expression, collectively confirm our model that the Mad1–Mad2 pathway does not play a role in the proper segregation of broken chromatids (Royou et al., 2010).

Next, we analyzed the dynamics of Mps1 on broken chromosomes. Mps1 functions in the SAC response by controlling the dynamics of Bub3, BubR1, and Cdc20 at the kinetochore (Shepherd et al., 2012; Conde et al., 2013; Espert et al., 2014). We found that the GFP::Mps1 signal was weak, but nevertheless visible on the kinetochore; however, no signal was detected near the lagging broken chromatids during anaphase (Fig. 3 F). In addition, GFP::BubR1 was recruited on laser-induced breaks in the *mps1<sup>1</sup>* mutant. Collectively, these results suggest that Mps1 does not mediate BubR1 recruitment to broken chromatids (Fig. 3 G).

We have previously reported that Polo localizes to the tether, where it promotes the proper segregation of broken chromatids (Royou et al., 2010). Recently, studies in mammalian cells show that Polo-like kinase 1 phosphorylates BubR1 on its KARD motif, which promotes BubR1 association with the phosphatase subunit PP2A-B56 $\alpha$  at the kinetochore during prometaphase/metaphase (Suijkerbuijk et al., 2012; Kruse et al., 2013; Espert et al., 2014). These observations prompted us to examine the involvement of Polo-mediated phosphorylation of BubR1's KARD motif in BubR1 recruitment to the tether during mitosis. To test this idea, we replaced the putative Polo-dependent phosphorylation sites, S685, S691, and T695, in the *Drosophila* BubR1 KARD motif with either alanine (GFP::BubR1-KARD-A) or aspartate (GFP::BubR1-KARD-D) to prevent or mimic the phosphorylation, respectively. The expression of either GFP::BubR1-KARD-D or GFP::BubR1-KARD-A did not rescue the *bubR1<sup>1</sup>* null mutant and induced an increase in the mitotic index resulting from an extended prometaphase (unpublished data). This phenotype, similar to the one observed in vertebrates (Kruse et al., 2013), suggests a conserved function for the *Drosophila* BubR1 KARD motif in promoting kinetochore–microtubule attachments. Both GFP::BubR1-KARD-D and GFP::BubR1-KARD-A constructs remained associated with the tether, suggesting that the polo-mediated phosphorylation of BubR1's KARD motif does not control BubR1 dynamics on DNA breaks in mitosis (Fig. 3, H and I). These results, however, do not rule out the possibility that Polo directly or indirectly promotes Bub3–BubR1 localization on DSBs.

### The DNA damage checkpoint kinases Chk1 and ATM do not mediate BubR1 recruitment to DNA breaks

*Drosophila* BubR1 localizes on uncapped telomeres, and this recruitment is attenuated in DNA damage checkpoint-compromised cells, including *atm<sup>tefu</sup>* and *chk1<sup>gtp</sup>* mutants (Musrò et al., 2008). Uncapped telomeres resemble DSBs, leading us to posit that a similar pathway could control BubR1 recruitment to both uncapped telomeres and DNA breaks. To test this hypothesis, we monitored the localization of BubR1 on I-CreI-induced breaks in *chk1<sup>gtp</sup>* and *atm<sup>tefu</sup>* mutants. BubR1 signal was visible on the tether in mitosis in both mutants, consistent with previous observations (Fig S2; Royou et al., 2010). These results indicate that attenuation of Chk1 and ATM kinase activity does not prevent BubR1 localization on DSBs.

### Fizzy is recruited to the tether in a BubR1 KEN box-dependent manner

We have previously found that the expression of BubR1 carrying two mutations in its KEN box (*bubR1-KEN*), which abolishes BubR1 SAC activity (Rahmani et al., 2009), impairs faithful broken chromatid transmission (Royou et al., 2010). Given that the KEN box is required for BubR1 association with Cdc20 (called Fizzy in *Drosophila*; Rahmani et al., 2009), we reasoned that BubR1 may sequester Fizzy (Fzy) on the tether during mitosis. To test this hypothesis, we first examined the dynamics of GFP::Fzy in live cells carrying broken chromosomes induced by I-CreI expression or laser ablation. GFP::Fzy accumulated on the kinetochore during prometaphase and disappeared progressively from the kinetochore during anaphase (Fig. 4, A and B; Raff et al., 2002; Schittenhelm et al., 2007, 2009). In addition, GFP::Fzy accumulated on I-CreI- and laser-induced breaks from prometaphase to telophase (Fig. 4, A and B; Video 5; and Video 7).

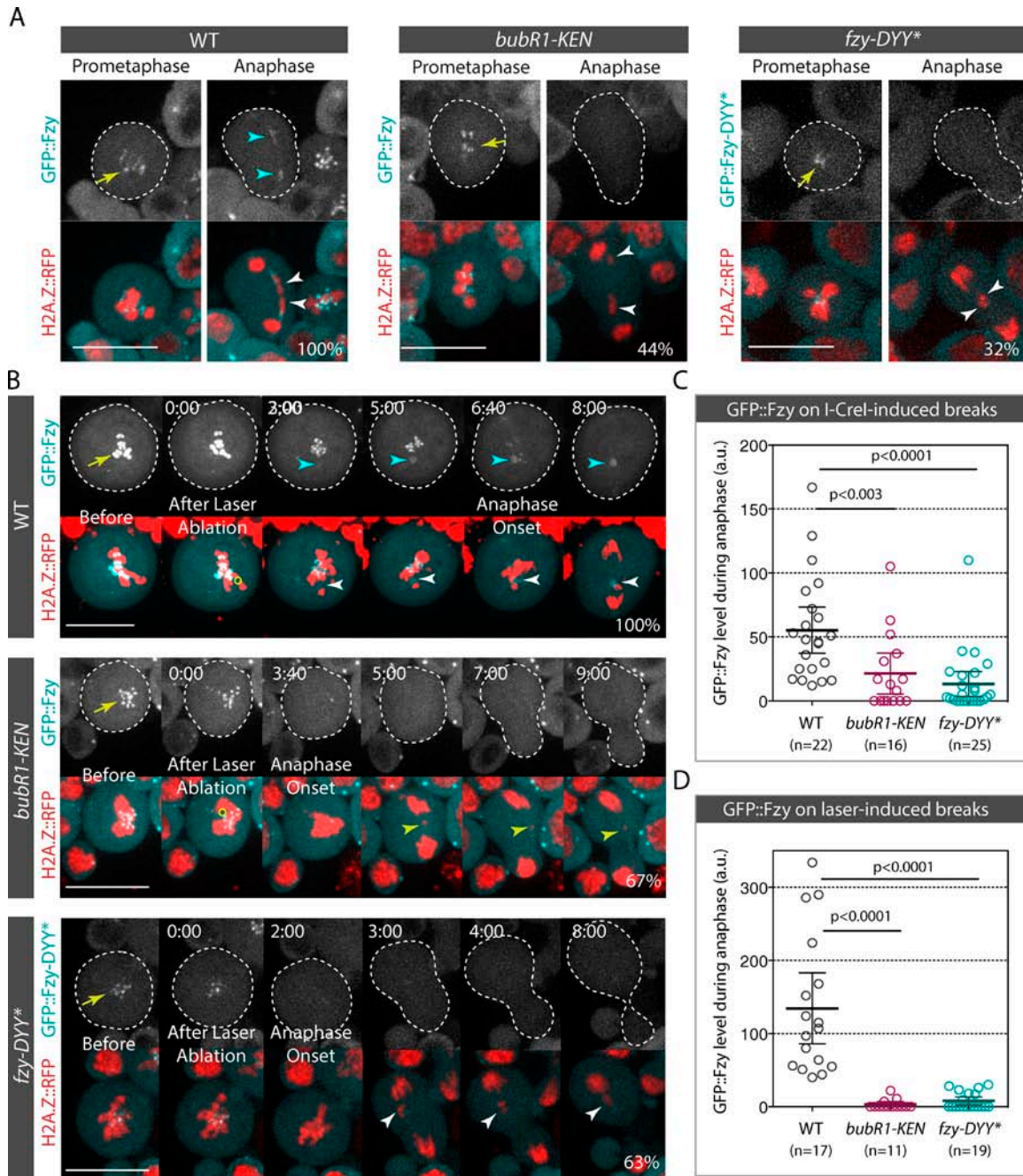
We could not detect either Cdh1 (called Fzy-related [Fzr] in *Drosophila*), the other cofactor of the APC/C, or the APC/C core complex subunits Cdc16 and Cdc27 on DNA breaks during mitosis, suggesting that the pool of Fzy recruited on DNA breaks is not associated with the APC/C core complex (Fig. S3).

To assess whether Fzy recruitment on DNA breaks was dependent on the BubR1 KEN box, we monitored GFP::Fzy dynamics in *bubR1-KEN* mutants after I-CreI induction or laser ablation. A great proportion of *bubR1-KEN* mutant cells failed to localize GFP::Fzy on I-CreI-induced tethers and laser-induced breaks (Fig. 4, A–D; Video 6; and Video 8). This result suggests that Fzy recruitment to DNA breaks is mediated via its interaction with the BubR1 KEN box.

To test this idea, we examined the localization of a Fzy mutant that has a reduced affinity for the BubR1 KEN box. The interaction of human Cdc20 with the first KEN box of BubR1 involves residues D184, Y185, and Y186 (Tian et al., 2012). These residues are conserved in *Drosophila* Fzy and correspond to D210, Y211, and Y212 (Fig. S4 A). We constructed a Fzy mutant in which the DYY residues are mutated to alanine (Fzy-DYY\*). The in vitro binding efficiency of Fzy-DYY\* to GST-BubR1[1–337], the BubR1 KEN domain including the KEN box, decreased by 50% (Fig. S4 B). This reduced binding efficiency of Fzy-DYY\* to the BubR1 KEN domain was associated with a dramatic decrease in GFP::Fzy-DYY\* levels on I-CreI- and laser-induced DNA breaks in vivo (Fig. 4, A–D). Collectively, these results are consistent with a model in which Fzy is sequestered on DNA breaks throughout mitosis via an interaction with the BubR1 KEN box.

### Impairment of Fzy recruitment to DNA breaks is associated with severe defects in broken chromatid segregation

Next, we assessed the physiological consequences on acentric chromatid segregation when Fzy is no longer recruited to DNA breaks. We monitored the frequency of abnormal segregation of acentric fragments, as well as the rate at which the last broken chromatid moved poleward in wild-type (WT), *bub3<sup>1</sup>*, *BubR1-KEN*, and *fzy-DYY\** mutant cells after I-CreI expression. In agreement with our previous observations, the majority of WT cell divisions produced daughter cells with proper genome content as a result of the equal segregation of acentric chromatids (Fig. 5 A, top; Royou et al., 2010). Occasionally, the broken chromatids partitioned abnormally, producing two daughter



**Figure 4. Fzy is recruited on I-Crel- or laser-induced breaks in a BubR1 KEN box-dependent manner.** (A) Time-lapse images of WT (also see Video 5), *bubR1-KEN* (also see Video 6), and *fzy-DYY\** neuroblasts expressing I-Crel. WT and *bubR1-KEN* mutant cells express GFP::Fzy, and *fzy-DYY\** mutant cells express GFP::Fzy-DYY\*. The yellow arrows and cyan arrowheads indicate the localization of GFP::Fzy and GFP::Fzy-DYY\* on the kinetochore and tether. The white arrowheads indicate the I-Crel-induced acentric chromatids. 100% of WT cells exhibited GFP::Fzy signal on the tether ( $n = 22$ ). In contrast, no GFP::Fzy signal on the tether was detected in 44% of *bubR1-KEN* mutant cells ( $n = 16$ ). GFP::Fzy-DYY\* signal was not visible in 32% of cells ( $n = 25$ ). (B) Time-lapse images of WT (also see Video 7), *bubR1-KEN* (also see Video 8), and *fzy-DYY\** mutant cells before and after laser ablation. The yellow arrows indicate the accumulation of GFP::Fzy and GFP::Fzy-DYY\* on kinetochores. The yellow circles correspond to the zones of laser ablation. Time (given in minutes/seconds) 0:00 corresponds to the first acquisition immediately after laser ablation. The white arrowheads indicate laser-induced damage. The cyan arrowheads show the appearance of GFP::Fzy at the site of chromosome damage. For WT cells, the percentage represents the frequency of cells with GFP::Fzy signal on DNA breaks ( $n = 17$ ). In the *bubR1-KEN* mutant, the percentage denotes the frequency of cells without GFP::Fzy signal on laser-induced damage ( $n = 11$ ). Finally, for the *fzy-DYY\** mutant, the percentage indicates the frequency of cells with no detectable GFP::Fzy-DYY\* signal on laser-induced breaks ( $n = 19$ ). The cells are delineated with dotted lines. Bars, 10  $\mu\text{m}$ . (C) Scatter dot plot of GFP::Fzy and GFP::Fzy-DYY\* levels at the site of the I-Crel-induced tether during anaphase in WT, *bubR1-KEN*, and *fzy-DYY\** mutants. (D) Scatter dot plot of GFP::Fzy and GFP::Fzy-DYY\* levels at the site of the laser-induced breaks during anaphase. (C and D)  $n =$  number of cells. The GFP level is normalized to the cytoplasmic GFP signal (see Materials and methods section Image analysis for quantification details). A Mann-Whitney nonparametric test was used to calculate p-values. Error bars represent mean  $\pm$  95% confidence interval. a.u., arbitrary units.

cells with incorrect genome content (Fig. 5 A, middle and bottom; and Fig. 5 B). The majority of the broken fragments segregated within 4 min after anaphase onset (Fig. 5 C).

Given that Bub3 promotes BubR1 recruitment to DNA breaks and that BubR1 is required for the proper segregation of broken fragments, we expected to observe a high frequency of abnormal acentric segregation in mutant cells that have a reduced level of Bub3. Consistently, the frequency of abnormal segregation of broken chromatids was dramatically increased in *bub3<sup>1</sup>* mutants (Fig. 5 B). Moreover, a great proportion of chromatids exhibited slow or no poleward movement in *bub3<sup>1</sup>* mutants (Fig. 5 C).

We have previously shown that the expression of one copy of the *bubR1-KEN* mutant transgene in the *bubR1<sup>1</sup>* null background impaired broken chromatid segregation. Although the expression of one copy of the *bubR1-KEN* transgene was sufficient to rescue the lethality of the *bubR1<sup>1</sup>* null allele, it may not have been sufficient to support the segregation of broken chromatids. Alternatively, the severe broken chromatid segregation defects in *bubR1-KEN* mutants may reflect a specific role for the KEN motif in the mechanism that facilitates the proper poleward movement of the broken fragments. To distinguish between these possibilities, we analyzed the segregation of broken chromatids in *bubR1-KEN(2X)* mutants in which the transgene is expressed from two copies. We found that the frequency of cells that fail to properly segregate the broken fragments increased significantly in the *bubR1-KEN(2X)* mutant compared with the WT (60 vs. 23%; Fig. 5 B). This frequency is similar to that observed for one copy of *bubR1-KEN* (Royou et al., 2010). In addition, a large number of *bubR1-KEN(2X)* mutant cells exhibited slow or no poleward movement of broken fragments (Fig. 5 C). These results indicate that the KEN box plays a specific role in facilitating the faithful segregation of broken chromatids.

The observation that loss of the BubR1 KEN box impairs Fzy recruitment to DNA breaks prompted us to test whether the high frequency of broken chromatid missegregation in the *bubR1-KEN* mutant was a direct consequence of a lack of Fzy sequestration on DNA breaks. To do so, we monitored the segregation of broken chromatids in cells expressing the Fzy-DYY\* mutant that no longer associates with DNA breaks (Fig. 4). Fzy-DYY\* mutants expressed from one or two copies (2X) in a *fzy* heterozygote mutant exhibited similar frequencies of cells with missegregated acentric fragments as *bubR1-KEN* mutants. These defects were more severe than the defects observed in *fzy* heterozygote mutants, reflecting a dominant effect of Fzy-DYY\* expression (Fig. 5, B and C). Collectively, these results indicate that the BubR1 KEN box-mediated recruitment of Fzy to DNA breaks plays an important role in the proper transmission of damaged chromosomes.

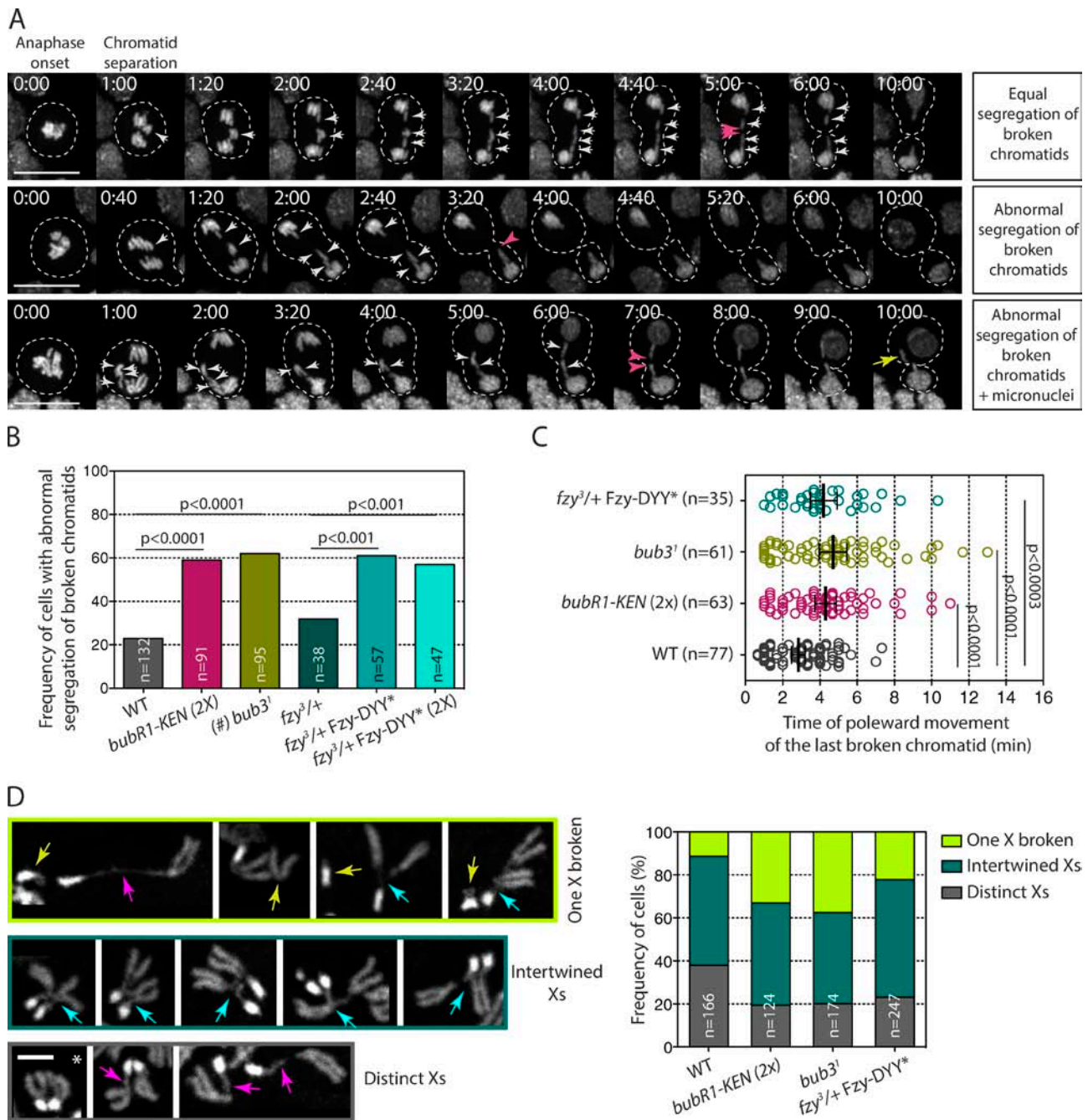
To gain insight into the possible causes of the elevated acentric missegregation in *bub3<sup>1</sup>*, *bubR1-KEN*, and *fzy-DYY\** mutants, we examined the morphology of the X chromosome after I-CreI expression in fixed prometaphase neuroblasts. As previously reported, three chromosome X configurations were observed in all genotypes, including the WT (Fig. 5 D; Royou et al., 2010). In the first configuration, both X chromosomes were distinct from each other and had normal morphologies, or exhibited loosely condensed chromatid threads that maintained the centric and acentric chromosome fragments together (Fig. 5 D, bottom, pink arrows). This configuration was found in almost 40% of WT cells but was reduced to 20% in *bub3<sup>1</sup>*,

*bubR1-KEN*, and *fzy-DYY\** mutants (Fig. 5 D). In the second configuration, at least one X chromosome was broken into two distinct fragments (Fig. 5 D, top, yellow arrows). In agreement with our previous observation, we found that the number of WT cells exhibiting X fragments without a tether was minor (11%;  $n = 166$ ). In contrast, the frequency of cells with clear broken X fragments was double in the *fzy-DYY\** mutant and triple in *bub3<sup>1</sup>* and *bubR1-KEN* mutants. These cells are likely to produce aneuploid cells. However, the fact that the frequency of cells displaying a broken chromosome X in prometaphase is lower than the frequency of cells with missegregated acentrics in both the WT and mutants implies that the presence of broken fragments in prometaphase is not the sole cause of acentric missegregation. The last and most prevalent configuration in all genotypes was intertwined X homologues (Fig. 5 D, middle, cyan arrows). Because I-CreI predominantly induces DNA damage during interphase in our assay, this X configuration may be the result of unresolved DNA repair intermediates produced during the preceding interphase. These entanglements may be problematic during the segregation of sister chromatids. The tension applied to the X homologues with entangled tethers during anaphase may result in tether rupture, inducing missegregation of the fragments. Tether breakage may occur more frequently in *bub3<sup>1</sup>*, *bubR1-KEN*, and *fzy-DYY\** mutants than WT cells. All together, these results favor a model in which the structure of the tether is more fragile or unstable when Fzy recruitment to DNA breaks is reduced.

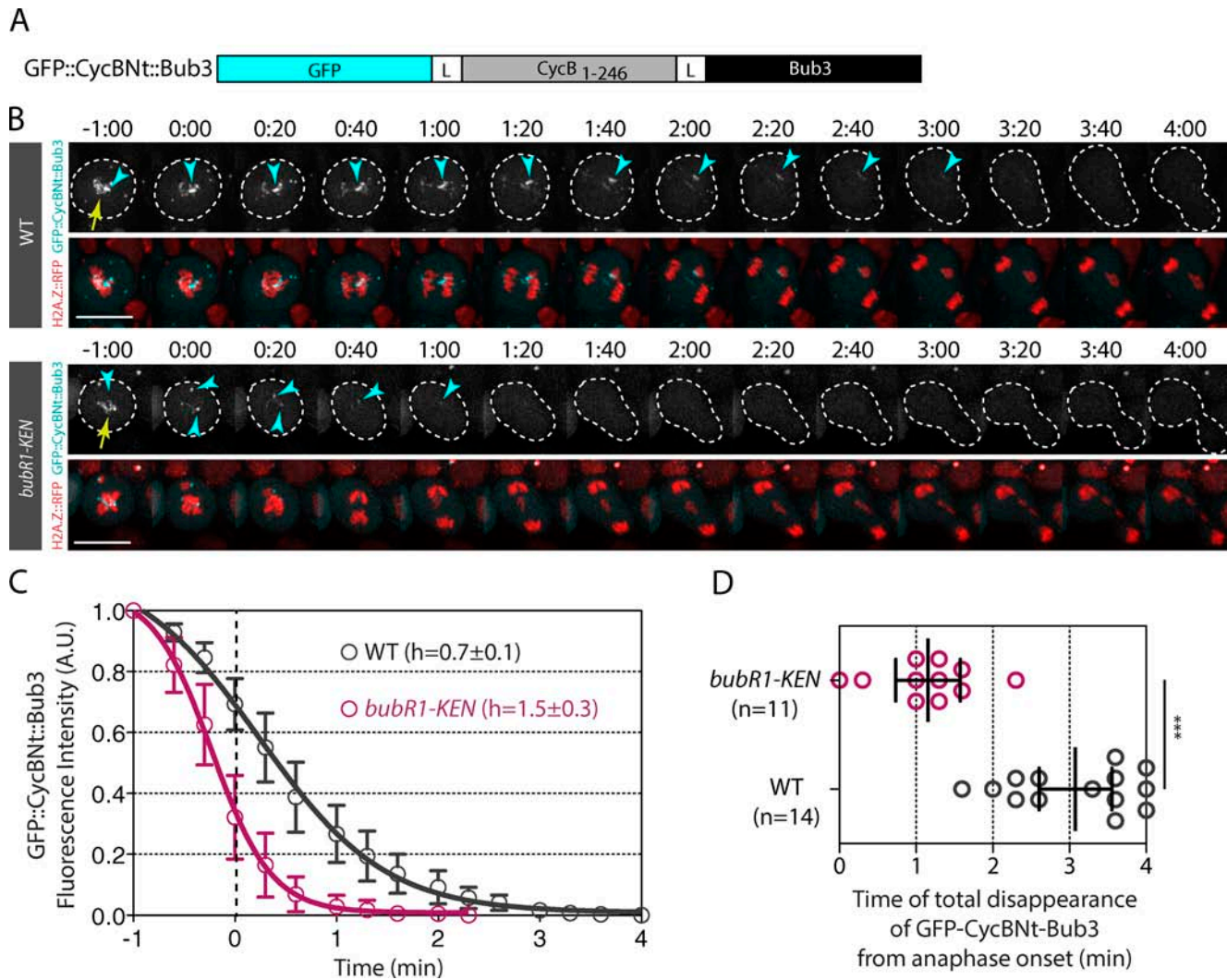
#### BubR1 induces local APC/C inhibition on the tether during early anaphase

Our results indicate that Fzy is sequestered on breaks/tethers throughout mitosis, largely via its association with the BubR1 KEN motif. Abrogation of this interaction impairs the proper segregation of broken chromatids. This raises the possibility that the BubR1-mediated sequestration of Fzy locally inhibits the APC/C on the tether, and this inhibition is required to maintain the integrity of the tether by preventing the degradation of key APC/C substrates even during anaphase. To test this idea, we monitored the localization of Securin and Cyclin B, two established APC/C substrates. We tagged Securin with GFP on its N or C terminus and analyzed its dynamics in mitotic cells with broken chromosomes. GFP::Securin and Securin::GFP were uniformly cytoplasmic during prometaphase (Fig. S5 A and not depicted). The signal disappeared gradually and globally during anaphase, likely because of its degradation by the proteasome. As reported previously, GFP::Cyclin B localized on the kinetochore, spindle, and centrosome during prometaphase and disappeared progressively during anaphase (Fig. S5 A; Huang and Raff, 1999). Both GFP::Cyclin B and GFP::Securin did not localize specifically on the tether during anaphase. In addition, no difference in the rate of GFP::Cyclin B signal disappearance was observed between cells with or without I-CreI expression (Fig. S5 B). It therefore seems unlikely that Securin and Cyclin B play a direct role in regulating the faithful segregation of broken chromosomes.

To determine whether BubR1 localization on the tether induces local APC/C inhibition, we created a synthetic APC/C substrate that associated with the tether. We fused the first 246 amino acids of Cyclin B, which contains the DEAD box, the recognition motif for Fzy, and the lysines that are ubiquitinated by the APC/C within full-length Bub3. GFP was fused to the N terminus of the probe to monitor fluorescence disappearance



**Figure 5. *bubR1-KEN*, *bub3'*, and *fzy-DYY\** mutants exhibit severe defects in broken chromatid segregation.** (A) Time-lapse images of neuroblasts expressing I-Crel and labeled with H2A.Z::RFP. The top row shows an example of a dividing cell with equal partition of the broken X chromatids (white arrows), which produces euploid daughter cells. The middle and bottom rows show examples of cells with abnormal segregation of broken chromatids, where three X broken chromatids segregate in one daughter cell (white arrows). These divisions will produce two aneusomic daughter cells with, in some cases, visible micronuclei (yellow arrow, bottom). The pink arrowheads indicate the time at which the last acentric fragments move poleward. Time is given in minutes/seconds. Bars, 10  $\mu$ m. (B) Histogram showing the frequency of neuroblast divisions with abnormal segregation of broken chromatids after I-Crel expression.  $n$  = number of cells. A Fisher exact test was used to calculate the  $p$ -value. (#) Given that *bub3'* mutant cells exhibit a high frequency of anaphase with whole lagging chromosomes (Basu et al., 1999; Logarinho et al., 2004; Lopes et al., 2005), cells in which no clear lagging broken chromatids could be followed because of extensive chromosome segregation defects were excluded from our analysis. (C) Scatter dot plot showing the time at which the last acentric chromatid starts moving poleward. The black lines correspond to mean  $\pm$  95% confidence interval. Time 0:00 corresponds to anaphase onset.  $n$  = number of cells. A Mann-Whitney nonparametric test was used for calculating  $p$ -values. (D) DAPI staining of X chromosomes from fixed neuroblasts after I-Crel expression. The bottom row illustrates cells exhibiting two distinct X chromosomes with no apparent tether, indicated by an asterisk, or apparent tether, indicated by pink arrows. The middle row represents intertwined X homologues (cyan arrows), and the top row shows an example of cells with one X broken fragment (yellow arrows). The histogram shows the frequency of cells with either two distinct Xs with or without tethers, intertwined X homologues, or at least one X broken.  $n$  = number of cells. Bar, 2  $\mu$ m. *bubR1-KEN(2X)* corresponds to *bubR1* null cells expressing two doses of the RFP::BubR1-KEN transgene; *fzy*<sup>3</sup>/+ corresponds to *fzy*<sup>3</sup> heterozygote mutant cells; and *fzy*<sup>3</sup>/+ *Fzy-DYY\** and *fzy*<sup>3</sup>/+ *Fzy-DYY\** (2X) correspond to the *fzy*<sup>3</sup> heterozygote carrying one or two doses of the GFP::Fzy-DYY\* transgene.



**Figure 6. The APC/C synthetic substrate GFP::CycBnt::Bub3 is maintained on the tether during early anaphase in a BubR1 KEN box-dependent manner.** (A) Scheme of the APC/C synthetic substrate GFP::CycBnt::Bub3. The N terminus (including the amino acids 1–246) of Cyclin B (CycB<sub>1–246</sub>) was fused to its N terminus to GFP and on its C terminus to full-length Bub3. The CycBnt sequence was flanked with a 4x glycine–alanine linker (L). (B) Time-lapse images of WT and *bubR1-KEN* mutant cells after I-CreI induction labeled with H2A.Z::RFP and GFP::CycBnt::Bub3. The kinetochore and tether localization of GFP::CycBnt::Bub3 are indicated with yellow arrows and cyan arrowheads, respectively. Bar, 10  $\mu$ m. (C) Quantitative analysis of the disappearance of the GFP::CycBnt::Bub3 signal on kinetochores and tethers. The graph shows the fluorescence intensity of GFP signal on kinetochores and tethers over time (see Fig. S5 for raw data and Materials and methods section Image analysis for details on the quantification). The fluorescence intensities were normalized to the fluorescence intensity measured at the time point –1 min. The 0 of the x axis corresponds to anaphase onset as defined by the onset of sister chromatid separation. The signal was measured every 20 s. (D) Scatter dot plot showing the time of complete disappearance of the signal of GFP::CycBnt::Bub3 in WT and *bubR1-KEN* mutant cells expressing I-CreI. The time starts at anaphase onset. The black lines correspond to mean  $\pm$  95% confidence interval. A Mann-Whitney nonparametric test was used to calculate p-values (\*\*\*,  $P < 0.001$ ). A.U., arbitrary units.

over time (Fig. 6 A). We then measured the signal of the synthetic probe, called GFP::CycBnt::Bub3, on the kinetochore and tether over time in WT and *bubR1-KEN* mutants after I-CreI expression (Fig. 6, B–D; Fig. S5 D; Video 9; and Video 10). We controlled that the GFP::CycBnt::Bub3 signal disappeared rapidly from the kinetochore in cells without broken chromosomes (WT no heat shock [HS]); Fig. S5, C and D). If tether-associated BubR1 inhibits the APC/C locally via the sequestration of Fzy, we would expect to detect a *bubR1-KEN* box-dependent delay of GFP::CycBnt::Bub3 degradation on the tether during anaphase. Consistently, in WT cells, GFP::CycBnt::Bub3 disappeared from the tether at a twofold slower rate than in *bubR1-KEN* mutant cells ( $h = 0.7 \pm 0.1$  vs.  $h = 1.5 \pm 0.3$ ; Fig. 6 C). The signal disappeared completely from the tether on average 3 min after anaphase onset in control cells,

compared with 1 min in *bubR1-KEN* mutant cells (Fig. 6 D). These results are consistent with our proposal that tether-associated BubR1 is sufficient to protect APC/C substrates locally from degradation.

## Discussion

In this work, we showed that BubR1 depends on its association with Bub3 to localize on I-CreI- and laser-induced DNA breaks during mitosis, where it sequesters Fzy and promotes the inhibition of the APC/C locally. Failure to sequester Fzy on DNA breaks by altering Fzy's interaction with the BubR1 KEN box induces broken chromatid missegregation. We propose that Bub3–BubR1-mediated APC/C inhibition on DNA breaks preserves

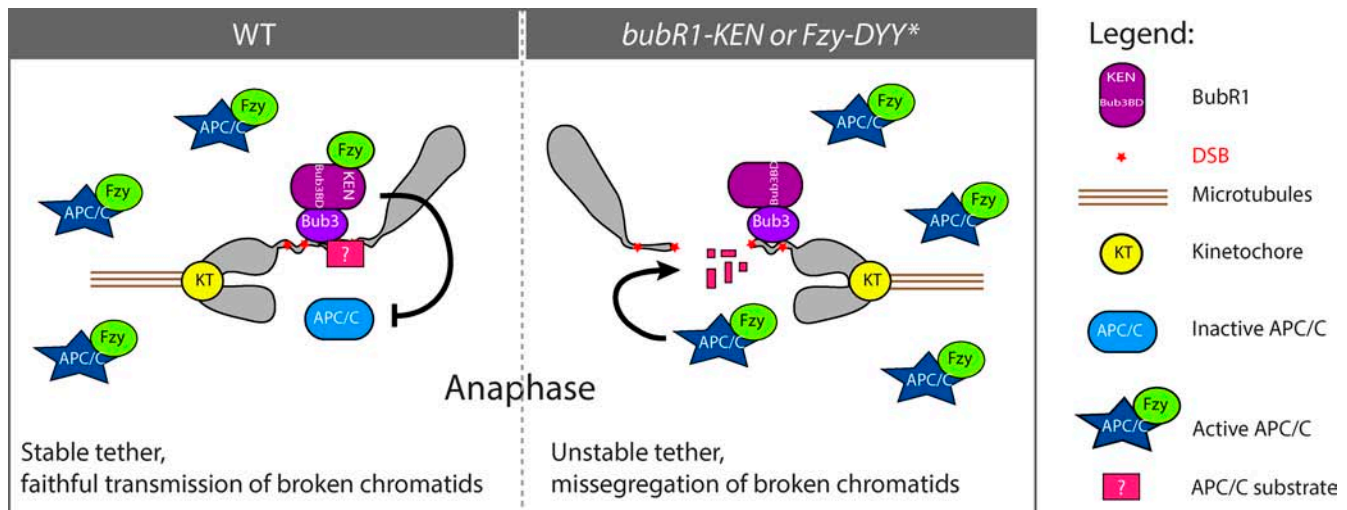


Figure 7. **Model for Bub3–BubR1 function on the tether/DNA breaks.** The BubR1–Bub3 complex sequesters Fzy on broken chromosomes from prometaphase to late anaphase, preventing activation of the APC/C locally and transiently. This inhibition may prevent the APC/C-dependent degradation of a key factor (pink square with question mark) required to maintain the two broken fragments tethered and to facilitate their proper segregation. In *bubR1-KEN* or *fzy-DYY\** mutants, the Fzy-mediated activation of the APC/C around the broken fragments allows the premature degradation of the unknown factor, which impairs the tethering of the broken fragments and their correct segregation.

a key component required to tether the broken fragments, thereby ensuring their proper transmission (Fig. 7).

The upstream component that recruits the Bub3–BubR1 complex to DNA breaks has yet to be identified. In yeast and mammals, the interaction of BubR1 and Bub3 with KNL1 plays an important role in their recruitment to the kinetochore (Kiyomitsu et al., 2007, 2011; D’Arcy et al., 2010; Bolanos-Garcia et al., 2011). However, a recent structural study on human BubR1 revealed that mutations in the tetratricopeptide repeats motif that prevent its association with KNL1 do not affect its kinetochore localization (Krenn et al., 2012). Moreover, accumulation of BubR1 to kinetochores in *Drosophila spc105* mutant embryos is only mildly reduced (Schittenhelm et al., 2009). These data suggest that an alternative pathway recruits Bub3–BubR1 to the kinetochore. Therefore, it is possible that a similar pathway regulates Bub3–BubR1 localization on DNA breaks. The observation that the dynamics of the Bub3–BubR1 complex on the kinetochore and tether/DSBs are dramatically different does not favor this idea. Indeed, although Bub3 and BubR1 dissociate from kinetochores attached to microtubules in metaphase, they remain abundant on broken chromatids well into anaphase. Similarly, both proteins accumulate rapidly on laser-induced breaks in all stages of mitosis, including anaphase. This suggests that different signaling events control the dynamics of Bub3–BubR1 on the kinetochore and DNA breaks. Alternatively, a similar pathway may recruit and dissociate Bub3–BubR1 at the kinetochore and broken chromosomes, but the signals controlling the dynamics of both proteins on DNA breaks may be more robust and resistant to the global activation of APC/C during anaphase. Although no evidence for BubR1 or Bub3 affinity for naked DNA or uncondensed chromatin has been reported thus far, it is possible that the Bub3–BubR1 complex binds directly to chromatin or DNA at the site of DSBs. The I-CreI- and laser-mediated DNA damage may induce the unwinding of the chromatin at the site of the breaks, thus exposing nucleosomes and DNA to the Bub3–BubR1 complex.

Our work demonstrates that the Bub3–BubR1 complex recruits Fzy to the tether/DSBs. Previous work on SAC activity

indicated that Mad2 association with Cdc20 is a prerequisite for efficient Bub3–BubR1 binding to Cdc20 and subsequent inhibition of APC/C (Sudakin et al., 2001; Kulukian et al., 2009). In contrast, we found that the Bub3–BubR1 complex efficiently recruits Fzy to DSBs without Mad2 and induces local APC/C inhibition well into anaphase, a period during which the APC/C is globally active. We propose that Bub3–BubR1–Fzy-mediated local APC/C inhibition around the DSBs protects key components required to tether the two broken fragments, thereby assuring their proper transmission. Our findings, that the failure to recruit Fzy to DSBs led to the premature activation of APC/C around the breaks associated with an elevated frequency of broken chromatid missegregation, are consistent with this model.

The exact nature of the DNA damage that triggers the recruitment of Bub3–BubR1–Fzy complexes is not defined. We also do not know whether I-CreI- and laser-induced damages create different types of DNA structures. However, the findings that DNA damages created during mitosis by either genotoxic agents, endonucleases, x ray, or laser irradiation consistently trigger the accumulation of components involved in DDR signaling support the idea that these insults share common structural characteristics that promote the recruitment of both DDR and Bub3–BubR1–Fzy complexes (Melo et al., 2001; Kaye et al., 2004; Mari et al., 2006; Giunta et al., 2010; Gomez-Godinez et al., 2010; Royou et al., 2010; Peterson et al., 2011; Orthwein et al., 2014; Silva et al., 2014; Benada et al., 2015). It is therefore possible that the APC/C substrates protected by Bub3–BubR1–Fzy may be components of the DDR pathway.

Our findings that tether-associated Bub3–BubR1 inhibits the APC/C well into anaphase support an alternative possibility: that Bub3–BubR1 protects an APC/C substrate that acts to resolve altered DNA structures during anaphase. We found that X homologues are intertwined in the majority of WT and mutant cells after endonuclease expression. These entanglements may produce catenated DNA strands that require resolution during anaphase. Impairing the resolution of these entanglements would result in slow chromatid poleward movements and elevated frequencies of chromatid missegregation resulting from



the rupture of one of the strands. Bub3–BubR1-mediated local inhibition of APC/C activity may facilitate the resolution of these entanglements. Consistently, we found that these entanglements had little effect on acentric chromosome segregation in WT cells but were associated with an increased frequency of slow and improper segregation of acentric fragments in *bub3*, *bubR1-KEN*, and *fzy-DYY\** mutants. Studies on catenated DNA structures, called ultra-fine DNA bridges, have greatly improved our understanding of catenated DNA resolution in mitosis and provide clues as to which putative APC/C substrate may be protected by Bub3–BubR1 during anaphase (Liu et al., 2014). The resolution of ultrafine DNA bridges, which originate from unreplicated DNA at fragile loci or catenated centromeric and telomeric DNA, involves the activities of the topoisomerases TopoII and TopoIII, the translocase PICH, the helicase BLM, and the DNA repair component Rif1 (Baumann et al., 2007; Chan et al., 2007, 2009; Barefield and Karlseder, 2012; Biebricher et al., 2013; Hengeveld et al., 2015). Such enzymes may be required to resolve entanglements from damaged chromosomes during anaphase and may be protected from global APC/C activity by Bub3–BubR1 complexes.

Future studies aimed at elucidating the composition of the chromatin structures associated with I-CreI– and laser-induced DNA damage will provide clues to the underlying mechanisms by which Bub3–BubR1 allows the proper segregation of broken chromatids.

## Materials and methods

### Fly strains

Flies were grown on corn flour and yeast extract medium in standard conditions, at 25°C. The *h2a.z>H2A.Z::RFP* (previously named H2Av::RFP; Talbert et al., 2012) stock was obtained from the Bloomington Drosophila Stock Center at Indiana University. *h2a.z>H2A.Z::GFP* was described previously (Clarkson and Saint, 1999). The *bub3>EGFP::Bub3* stock was provided by C. Lehner (Institute of Molecular Life Sciences, University of Zurich, Zurich, Switzerland). The *hsp70>I-CreI* strain has been described previously (Rong et al., 2002). The *bubR1<sup>1</sup>* and *bub3<sup>1</sup>* mutant alleles were described previously (Basu et al., 1999; Lopes et al., 2005). The *bubR1>mRFP::bubR1-KEN* mutant has also been previously reported (Rahmani et al., 2009). *cenP>CenP::EGFP*, *nuf2>EGFP::Nuf2*, *spc105>Spc105::EGFP*, *mad1>Mad1::EGFP*, and *mps1>EGFP::Mps1* stocks were previously characterized and were provided by C. Lehner and R. Karess (Institut Jacques Monod, Centre National de la Recherche Scientifique, Paris, France; Schittenhelm et al., 2007, 2009; Emre et al., 2011; Althoff et al., 2012). *mps1<sup>1</sup>* and *mad1<sup>1</sup>* mutants have been characterized previously (Fischer et al., 2004; Emre et al., 2011). The *chk1<sup>srp-1</sup>* allele was described previously (Fogarty et al., 1997). The *atm<sup>tef1-3</sup>* and *atm<sup>tef1-8</sup>* alleles have also been previously described (Silva et al., 2004). *ubi>GFP::Fzy*, *ubi>GFP::Cdc27*, *ubi>GFP::Cdc16*, and *ubi>GFP::Fzr* were described previously and were provided by J. Raff (Sir William Dunn School of Pathology, University of Oxford, Oxford, England, UK; Raff et al., 2002; Huang and Raff, 2002). *GFP::Cyclin B* has also been described previously (Huang and Raff, 1999). All the other transgenic stocks used in this work were produced in the laboratory: *ubi>GFP::BubR1[1]*, *ubi>mRFP::Bub3*, *ubi>GFP::BubR1-KARD-A*, *ubi>GFP::BubR1-KARD-D*, *ubi>GFP::Fzy-DYY\**, *ubi>GFP::Securin*, *ubi>securin::GFP*, and *ubi>GFP::CycBNt::Bub3*. The genotypes of the larvae used for each figure are listed in Table S1.

### Plasmid cloning

All plasmids were verified by sequencing before being injected into fly embryos to generate transgenic stocks (Bestgene Inc.).

**BubR1 truncated plasmid constructs.** All constructs were derived from a plasmid containing full-length BubR1 cDNA and cloned using Gateway technology. PCR products using the primers listed in Table S2 were inserted into the pDONR/Zeo vector (Life Technologies) to create entry clones. We generated the construct [Δ763–1,055] by a two-step PCR. The first PCR used four primers (F1, Δ3NTR, Δ3CTF, and R1). Using these products as matrices, a second PCR was performed using F1 and R1 primers. Entry vectors containing the truncated BubR1 sequence were recombined into the pUbi-GFP-GAT vector containing the ubiquitin promoter and an N-terminal GFP tag (a gift from J. Raff). The entry clones containing the BubR1 [1–337] sequence and the destination vector pDEST15 (Invitrogen) were used to generate a GST::BubR1 [1–337] plasmid using standard Gateway recombination.

**mRFP::Bub3 cloning.** The RFP::Bub3 construct was obtained by multistep cloning. First, 900 nt upstream of the Bub3 initiation codon was amplified from genomic DNA using the Bub3prom-F and Bub3prom-R oligonucleotides, introducing KpnI and XhoI restriction sites, respectively (Table S2). After digestion, the product was ligated into pBluescript KS (pBS KS; Agilent Technologies). The genomic Bub3 sequence with its 3′ untranslated region was amplified with Bub3gen-F and Bub3gen-R primers, introducing SmaI and XbaI sites, and cloned into the pBS KS Bub3 promoter plasmid (Table S2). mRFP was amplified from pCaSpeR4 mRFP::BubR1 (a gift from R. Karess) using mRFP-F and mRFP-R primers, introducing XhoI and SmaI sites and a linker coding for GAGAGAGA after the mRFP sequence. Ligation of this product resulted in the final pBS KS *bub3>mRFP::Bub3* vector. This construct was then transferred into the pCaSpeR4 vector using KpnI and XbaI restriction sites.

**GFP::CycBNt::Bub3 cloning.** The CycBNt sequence was amplified from a pDONR/Zeo-CycBNt vector obtained from GenScript using CycBNt-Gat-F (which contains the AttB1 Gateway sequence) and Bub3-Lnk-CycBNt-R primers (which adds a GAGAGAGA linker to the C terminus of CycBNt; Table S2). The Bub3 genomic sequence containing the GAGAGAGA linker on its N terminus was amplified from the pBS KS *g>mRFP-Bub3* vector with Lnk-Bub3-F and Bub3-R primers (with an AttB2 Gateway sequence; Table S2). The complete sequence was amplified from the two PCR products with CycBNt-Gat-F and Bub3-R primers. The construct was recombined with the pUbi-GFP-GAT destination vector to obtain the final plasmid *ubi>GFP::CycBNt::Bub3* using standard Gateway recombination.

**GFP::Fzy-DYY\* cloning.** A pUC57 vector containing the Fzy cDNA sequence in which the D210, Y211, and Y212 are changed to alanine (*fzy-DYY\**) and flanked with AttB sequences was obtained from GenScript. This construct was then used to create an entry clone subsequently recombined with the pUbi-GFP-GAT destination vector to obtain the final plasmid *ubi>GFP::Fzy-DYY\**.

**BubR1-KARD-A and BubR1-KARD-D cloning.** The BubR1-KARD-A construct was generated by a two-step PCR. In the first step, the 5′ and 3′ parts of the BubR1 coding DNA sequence were amplified with the F1/KARD-A(R) and KARD-A(F)/R1 primer pairs, respectively (Table S2). In a second step, the resulting PCR products were used in an overlapping PCR with the flanking F1/R1 primers to generate the whole mutated coding DNA sequence, which was then inserted into the pDONR-Zeo plasmid. The construct was recombined with the pUbi-GFP-GAT destination vector to obtain the final plasmid *ubi>GFP::BubR1-KARD-A*. The same strategy was used to obtain the *ubi>GFP::BubR1-KARD-D* plasmid, with the KARD-D(F) and KARD-D(R) primers (Table S2).

**GFP::Securin and Securin::GFP cloning.** For GFP::Securin fusion Gateway cloning, *Drosophila* Securin cDNA was amplified from pSecurin vector (LD16810; Drosophila Genomics Resource Center) using Securin-Nt-F and Securin-Nt-R primers for GFP N-terminal tagging and Securin-Ct-F and Securin-Ct-R for GFP C-terminal tagging (Table S2) and then inserted into pDONR/Zeo plasmid. Each plasmid was recombined with either the pUbi-GFP-GAT or pUbi-GAT-GFP destination vector to obtain ubi>GFP::Securin and ubi>Securin::GFP constructs.

#### Generation of $\alpha$ -GFP antibody

6xHis-tagged GFP was expressed in BL21-CodonPlus cells by IPTG induction at 37°C for 4 h. The fusion protein was subsequently purified by immobilized metal affinity chromatography using Ni-bound Sepharose. Approximately 1 mg of purified protein was used for rabbit immunization. Additional GFP protein was covalently coupled to Affigel 10 resin (Bio-Rad) and used for affinity purification of anti-GFP polyclonal antibodies from the sera.

#### Western blots

Adult flies were ground in 2× sample buffer (4% SDS, 20% glycerol, 10% 2-mercaptoethanol, 0.004% bromophenol blue, and 125-mM Tris-Cl, pH 6.8) containing protease inhibitor cocktail (Roche) and 1-mM PMSF (Thermo Fisher Scientific). The extracts were boiled for 5 min, centrifuged, and analyzed by 10% SDS-PAGE. After electrophoresis at 20 mA in running buffer (380-mM glycine, 50-mM Tris base, and 1% wt/vol SDS), proteins were transferred to nitrocellulose membrane (Protran) by Western blotting at 500 mA for 2 h at 4°C in transfer buffer (150-mM glycine, 25-mM Tris base, and 70% ethanol in distilled water). Membrane was blocked in TBS with Tween (TBST; 50-mM Tris-Cl, pH 7.5, 150-mM NaCl, and 0.1% vol/vol Tween 20) containing 5% dried nonfat milk for 1 h. The membrane was incubated overnight at 4°C with mouse anti- $\alpha$ -tubulin (1:750; DM1A; Sigma-Aldrich) and rabbit anti-GFP (1:1,500) primary antibodies diluted in TBST containing 5% dried nonfat milk. After washing in TBST and incubation with appropriate secondary antibodies (peroxidase-conjugated antibodies [DAKO] and fluorescently coupled antibodies [Molecular Probes]) diluted at 1:5,000 in TBST containing 5% dried nonfat milk, the membrane was developed with ECL (Thermo Fisher Scientific) or with Storm equipment with the appropriate lasers (Storm Trio).

#### GST::BubR1 [1–337] protein purification

Bacteria BL21-AI carrying the expression vector containing the GST::BubR1 [1–337] sequence was grown at 37°C to an optical density of 2.5, and expression was induced overnight at 18°C by the addition of 0.3-mM IPTG and 0.2% L-arabinose. Cells were harvested by centrifugation and frozen in liquid nitrogen. The frozen pellet was ground with dry ice in an electric grinder until a fine powder was obtained. The powder was transferred to a beaker cooled with liquid nitrogen, allowed to warm briefly at room temperature, and resuspended in five volume (wt/vol) lysis buffer (PBS containing 1.0-M NaCl, 0.5% Tween 20, and 1-mM PMSF) at 4°C. After sonication, the lysate was centrifuged at 25,000 rpm for 1 h. 10-mM DTT was then added to the supernatant. This solution was loaded onto a glutathione-beads column previously equilibrated with a five volume column of lysis buffer with 10-mM DTT. The column was washed with PBS containing 0.25-M KCl, 0.1% Tween 20, and 0.5-mM DTT and eluted with a buffer containing 50-mM Tris, pH 8.1, 0.25-mM KCl, and 5-mM reduced glutathione. Peak fractions were pooled and dialyzed in 50-mM Hepes, pH 7.6, 0.25-M KCl, and 30% glycerol. The purified GST-BubR1 [1–337] was stored at –80°C. This protocol is a slightly modified version of the protocol described previously (Carroll et al., 1998).

#### GFP::Fzy pull-down

24-h collections of embryos expressing either GFP, GFP::Fzy, or GFP::Fzy-DYY\* were dechorionated in 2% bleach and stored at –80°C in PBS and 1-mM PMSF. ~500 mg of embryos were mechanically ground in 200  $\mu$ l lysis buffer (50-mM Tris-Cl, pH 7.5, 0.1% Tergitol NP-40, 150-mM NaCl, 10-mM EDTA, 3-mM MgCl<sub>2</sub>, 1-mM PMSF, 1-mM sodium orthovanadate, and containing one tablet of protease inhibitor cocktail [Roche]). Lysates were centrifuged at 17,000 g for 20 min at 4°C, and clarified supernatants were transferred into clean tubes. The total protein concentration of each lysate was evaluated by the Bradford assay. The amount of GFP, GFP::Fzy, and GFP::Fzy-DYY\* in each lysate was estimated by Western blotting using mouse anti-GFP antibodies (1:500; Roche). The lysates were subsequently diluted in lysis buffer to obtain an equal concentration of GFP, GFP::Fzy, and GFP::Fzy-DYY\*. A fraction of each lysate was boiled in one volume of 2× Laemmli sample buffer for 5 min. Normalized extract was added to 50  $\mu$ g GST::BubR1 [1–337] immobilized on glutathione agarose beads (1  $\mu$ g/1  $\mu$ l of beads) in a final volume of 200  $\mu$ l. The lysates were incubated with the beads for 4 h at 4°C and subsequently centrifuged at 500 g for 2 min at 4°C. The beads were washed four times in lysis buffer without Tergitol NP-40 and finally resuspended in 25  $\mu$ l of 2× Laemmli before boiling for 5 min. Inputs and beads were analyzed by 12.5% SDS-PAGE. Western blots were probed using mouse anti-GFP antibodies (Roche) and anti-GST antibodies (Jose et al., 2015).

#### DAPI staining

The third instar larval central nervous system was dissected in PBS. Each brain was treated with 1% sodium citrate for 5 min and then transferred to a 10- $\mu$ l drop of fixative (45% acetic acid and 2% formaldehyde) on a coverslip and fixed for 5 min. The samples were squashed between a slide and a coverslip and frozen in liquid nitrogen. The slides were rinsed in PBS, dried, and mounted with 10  $\mu$ l of slow fade with DAPI (Invitrogen).

#### Live imaging and microscopy

DSBs at the ribosomal DNA locus, located on the X and Y chromosomes, were generated using I-CreI endonuclease under the control of a heat shock 70 promoter. Female third instar larvae were heat shocked for 1 h at 37°C in a water bath to induce I-CreI expression. After at least 1.5 h of recovery at room temperature, the larval central nervous system was dissected in fresh PBS and transferred to a 12- $\mu$ l drop of PBS on a coverslip. The preparation was slightly squashed between a slide and coverslip by aspiration of the liquid with a piece of paper as described previously (Buffin et al., 2005). The coverslip was sealed with halocarbon oil 700 (Sigma-Aldrich) and observed for 30–40 min under a microscope.

Live imaging was performed at room temperature with either a microscope (Axio-Observer.Z1; Carl Zeiss) and a 100× 1.4 Plan Apochromat oil objective equipped with 491-nm (100 mW; Cobolt Calypso) and 561-nm (100 mW; Cobolt Jive) lasers, a spinning disk (CSUX-A1; Yokogawa), and an electron-multiplying charge-coupled device (emCCD) camera (Evolve; Roper Scientific; all figure panels except Fig. 5 D), or a confocal microscope (SP8; Leica) with a 63× 1.4 Plan Apochromat oil objective equipped with 488-nm and 561-nm lasers and photomultipliers (Hybrid; PicoQuant; Fig. 5 D). The imaging systems were driven by MetaMorph (Molecular Devices) or Leica software.

A 355-nm pulsed laser (passively Q-switched SNV-20F-000) with a 21-kHz repetition rate, 0.8- $\mu$ J energy/pulse, 2 kW of peak power, and 400-ps pulse width, powered with an iLas PULSE system (Roper Scientific) and adapted to a microscope (Axio-Observer.Z1; Carl Zeiss), was used at 20% power for one pulse (100 ms) to induce chromosome breaks.

## Image analysis

Images in all panels are maximum projections (12 z steps of 0.5- $\mu$ m depth each). ImageJ (Fiji; National Institutes of Health) was used for image quantification. In Fig. 4 C, the integrated fluorescence intensity of GFP::Fzy on I-CreI-induced DNA breaks was measured on a single Z plane for 12 time points (starting at anaphase onset) and averaged. In Fig. 4 D, the integrated fluorescence intensity of GFP::Fzy on laser-induced DNA breaks was measured on a single Z plane for one time point during anaphase. Only pixels with intensity above the threshold, defined as the maximum pixel intensity in the cytoplasm, were included in the quantification. The GFP::Fzy levels on the tether and laser-induced breaks were normalized to the average intensity in the cytoplasm. In Fig. 6 and Fig. S5, the integrated fluorescence intensity of GFP::CycBNT::Bub3 was measured from a sum projection (5.5  $\mu$ m) at the kinetochore and tether (signal above the maximum pixel intensity in the cytoplasm) and normalized to the fluorescence intensity at the kinetochore and tether at metaphase (1 min before anaphase onset). Data points were fit to a sigmoid curve ( $Y = 1/[1 + 10^{(LogEC-X)*Hill\ slope}]$ ) using Prism software (GraphPad). The Hill slope (h) was used to compare the kinetics of GFP::CycBNT::Bub3 signal disappearance between the WT without I-CreI expression (WT no HS; Fig. S5, C and D), the WT after I-CreI expression (WT), and *bubR1-KEN* mutant cells after I-CreI expression (*bubR1-KEN*). In Fig. S5 B, the average fluorescence intensity of GFP::Cyclin B signal in the whole cell was measured over time from a sum projection (5.5  $\mu$ m). The signal was normalized to the average fluorescence intensity at anaphase onset (time = 0).

## Online supplemental material

Fig. S1 demonstrates that the Bub3-BD of BubR1 is required for its localization on both the kinetochore and tether. Fig. S2 shows that BubR1 is recruited on DNA breaks in *chk1* and *atm* mutants. Fig. S3 shows that the APC/C subunits Cdc16 and Cdc27 and the cofactor Fzr do not localize on DNA breaks. Fig. S4 shows the reduced affinity of Fzy-DYY\* for BubR1 N-terminal sequence. Fig. S5 shows the dynamics of GFP::Securin and GFP::Cyclin B during anaphase after I-CreI expression. It also shows the dynamics of GFP::CycBNT::Bub3 in cells without I-CreI expression. Video 1 shows the localization of GFP::BubR1 330–762 construct on kinetochore and the I-CreI-induced tether. Video 2 shows the lack of accumulation of GFP::BubR1 330–762 [E481K] on both kinetochore and tether. Video 3 shows the localization of GFP::Bub3 on I-CreI-induced tether. Video 4 shows the localization of GFP::BubR1 on laser-induced DNA breaks. Video 5 shows the localization of GFP::Fzy on the I-CreI-induced tether. Video 6 shows the reduced level of GFP::Fzy on I-CreI-induced DNA breaks in the *bubR1-KEN* mutant. Video 7 shows the appearance of GFP::Fzy on laser-induced DNA breaks. Video 8 shows the lack of GFP::Fzy accumulation on laser-induced DNA breaks in the *bubR1-KEN* mutant. Video 9 shows the disappearance of synthetic APC/C substrate GFP::CycBNT::Bub3 signal during anaphase. The signal remains on I-CreI-induced DNA breaks during early anaphase. Video 10 shows the disappearance of synthetic APC/C substrate GFP::CycBNT::Bub3 signal during anaphase in the *bubR1-KEN* mutant. The signal on DNA breaks disappears rapidly. Table S1 lists the genotypes of the larvae used for each figure. Table S2 lists oligonucleotide sequences. Online supplemental material is available at <http://www.jcb.org/cgi/content/full/jcb.201504059/DC1>.

## Acknowledgments

We thank Zohra Rahmani, Roger Karess, Christian Lehner, Claudio Sunkel, and Jordan Raff for sharing reagents. We thank all laboratory members for technical help and fruitful discussion.

N. Derive was supported by the University of Bordeaux. C. Landmann and E. Montebault were supported by grant ANR-12-PDOC-0020-01/ARC2-ChromSCeD. E. Montebault was also supported by Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS). M.-C. Clavier was supported by the University of Bordeaux. N. Founounou was supported by grant ATIP-AVENIR/INCa 2010-291 and Conseil Régional d'Aquitaine (grant 20111301010). D. Goutte-Gattat and P. Pierre-Elies were supported by grant ERC-STG-2012 GA311358-NoAneuploidy. D. McCusker was supported by grant ANR-13-BSV2-0015-01-POLARFLUX and CNRS. A. Royou was supported by grant ERC-STG-2012 GA311358-NoAneuploidy, Conseil Régional d'Aquitaine (grant 20111301010), and CNRS.

The authors declare no competing financial interests.

Submitted: 13 April 2015

Accepted: 6 October 2015

## References

- Althoff, F., R.E. Karess, and C.F. Lehner. 2012. Spindle checkpoint-independent inhibition of mitotic chromosome segregation by *Drosophila* Mps1. *Mol. Biol. Cell.* 23:2275–2291. <http://dx.doi.org/10.1091/mbc.E12-02-0117>
- Barefield, C., and J. Karlseder. 2012. The BLM helicase contributes to telomere maintenance through processing of late-replicating intermediate structures. *Nucleic Acids Res.* 40:7358–7367. <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gks407>
- Basu, J., E. Logarinho, S. Herrmann, H. Bousbaa, Z. Li, G.K. Chan, T.J. Yen, C.E. Sunkel, and M.L. Goldberg. 1998. Localization of the *Drosophila* checkpoint control protein Bub3 to the kinetochore requires Bub1 but not Zw10 or Rod. *Chromosoma.* 107:376–385. <http://dx.doi.org/10.1007/s004120050321>
- Basu, J., H. Bousbaa, E. Logarinho, Z. Li, B.C. Williams, C. Lopes, C.E. Sunkel, and M.L. Goldberg. 1999. Mutations in the essential spindle checkpoint gene *bub1* cause chromosome missegregation and fail to block apoptosis in *Drosophila*. *J. Cell Biol.* 146:13–28. <http://dx.doi.org/10.1083/jcb.146.1.13>
- Baumann, C., R. Körner, K. Hofmann, and E.A. Nigg. 2007. PICH, a centromere-associated SNF2 family ATPase, is regulated by Plk1 and required for the spindle checkpoint. *Cell.* 128:101–114. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2006.11.041>
- Benada, J., K. Burdová, T. Lidak, P. von Morgen, and L. Macurek. 2015. Polo-like kinase 1 inhibits DNA damage response during mitosis. *Cell Cycle.* 14:219–231. <http://dx.doi.org/10.4161/15384101.2014.977067>
- Biebricher, A., S. Hirano, J.H. Enzlin, N. Wiechens, W.W. Streicher, D. Huttner, L.H. Wang, E.A. Nigg, T. Owen-Hughes, Y. Liu, et al. 2013. PICH: A DNA translocase specially adapted for processing anaphase bridge DNA. *Mol. Cell.* 51:691–701. <http://dx.doi.org/10.1016/j.molcel.2013.07.016>
- Bolanos-Garcia, V.M., T. Lischetti, D. Matak-Vinković, E. Cota, P.J. Simpson, D.Y. Chirgadze, D.R. Spring, C.V. Robinson, J. Nilsson, and T.L. Blundell. 2011. Structure of a Blinkin-BUBR1 complex reveals an interaction crucial for kinetochore-mitotic checkpoint regulation via an unanticipated binding site. *Structure.* 19:1691–1700. <http://dx.doi.org/10.1016/j.str.2011.09.017>
- Buffin, E., C. Lefebvre, J. Huang, M.E. Gagou, and R.E. Karess. 2005. Recruitment of Mad2 to the kinetochore requires the Rod/Zw10 complex. *Curr. Biol.* 15:856–861. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cub.2005.03.052>
- Burton, J.L., and M.J. Solomon. 2007. Mad3p, a pseudosubstrate inhibitor of APC/Cdc20 in the spindle assembly checkpoint. *Genes Dev.* 21:655–667. <http://dx.doi.org/10.1101/gad.1511107>
- Carroll, C.W., R. Altman, D. Schieltz, J.R. Yates, and D. Kellogg. 1998. The septins are required for the mitosis-specific activation of the Gin4 kinase. *J. Cell Biol.* 143:709–717. <http://dx.doi.org/10.1083/jcb.143.3.709>
- Chan, K.L., P.S. North, and I.D. Hickson. 2007. BLM is required for faithful chromosome segregation and its localization defines a class of ultrafine anaphase bridges. *EMBO J.* 26:3397–3409. <http://dx.doi.org/10.1038/sj.emboj.7601777>
- Chan, K.L., T. Palmal-Pallag, S. Ying, and I.D. Hickson. 2009. Replication stress induces sister-chromatid bridging at fragile site loci in mitosis. *Nat. Cell Biol.* 11:753–760. <http://dx.doi.org/10.1038/ncb1882>
- Chen, R.H. 2002. BubR1 is essential for kinetochore localization of other spindle checkpoint proteins and its phosphorylation requires Mad1. *J. Cell Biol.* 158:487–496. <http://dx.doi.org/10.1083/jcb.200204048>

- Choi, E., and H. Lee. 2008. Chromosome damage in mitosis induces BubR1 activation and prometaphase arrest. *FEBS Lett.* 582:1700–1706. <http://dx.doi.org/10.1016/j.febslet.2008.04.028>
- Clarkson, M., and R. Saint. 1999. A His2AvDGFP fusion gene complements a lethal His2AvD mutant allele and provides an in vivo marker for *Drosophila* chromosome behavior. *DNA Cell Biol.* 18:457–462. <http://dx.doi.org/10.1089/104454999315178>
- Conde, C., M. Osswald, J. Barbosa, T. Moutinho-Santos, D. Pinheiro, S. Guimarães, I. Matos, H. Maiato, and C.E. Sunkel. 2013. *Drosophila* Polo regulates the spindle assembly checkpoint through Mps1-dependent BubR1 phosphorylation. *EMBO J.* 32:1761–1777. <http://dx.doi.org/10.1038/emboj.2013.109>
- D'Arcy, S., O.R. Davies, T.L. Blundell, and V.M. Bolanos-Garcia. 2010. Defining the molecular basis of BubR1 kinetochore interactions and APC/C-CDC20 inhibition. *J. Biol. Chem.* 285:14764–14776. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M109.082016>
- Dotiwala, F., J.C. Harrison, S. Jain, N. Sugawara, and J.E. Haber. 2010. Mad2 prolongs DNA damage checkpoint arrest caused by a double-strand break via a centromere-dependent mechanism. *Curr. Biol.* 20:328–332. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cub.2009.12.033>
- Elowe, S., K. Dulla, A. Uldschmid, X. Li, Z. Dou, and E.A. Nigg. 2010. Uncoupling of the spindle-checkpoint and chromosome-congression functions of BubR1. *J. Cell Sci.* 123:84–94. <http://dx.doi.org/10.1242/jcs.056507>
- Emre, D., R. Terracol, A. Poncet, Z. Rahmani, and R.E. Karess. 2011. A mitotic role for Mad1 beyond the spindle checkpoint. *J. Cell Sci.* 124:1664–1671. <http://dx.doi.org/10.1242/jcs.081216>
- Espert, A., P. Uluocak, R.N. Bastos, D. Mangat, P. Graab, and U. Gruneberg. 2014. PP2A-B56 opposes Mps1 phosphorylation of Knl1 and thereby promotes spindle assembly checkpoint silencing. *J. Cell Biol.* 206:833–842. <http://dx.doi.org/10.1083/jcb.201406109>
- Fischer, M.G., S. Heeger, U. Häcker, and C.F. Lehner. 2004. The mitotic arrest in response to hypoxia and of polar bodies during early embryogenesis requires *Drosophila* Mps1. *Curr. Biol.* 14:2019–2024. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cub.2004.11.008>
- Fogarty, P., S.D. Campbell, R. Abu-Shumays, B.S. Phalle, K.R. Yu, G.L. Uy, M.L. Goldberg, and W. Sullivan. 1997. The *Drosophila grapes* gene is related to checkpoint gene *chk1/rad27* and is required for late syncytial division fidelity. *Curr. Biol.* 7:418–426. [http://dx.doi.org/10.1016/S0960-9822\(06\)00189-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0960-9822(06)00189-8)
- Foley, E.A., and T.M. Kapoor. 2013. Microtubule attachment and spindle assembly checkpoint signalling at the kinetochore. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 14:25–37. <http://dx.doi.org/10.1038/nrm3494>
- Giunta, S., R. Belotserkovskaya, and S.P. Jackson. 2010. DNA damage signaling in response to double-strand breaks during mitosis. *J. Cell Biol.* 190:197–207. <http://dx.doi.org/10.1083/jcb.200911156>
- Gomez-Godinez, V., T. Wu, A.J. Sherman, C.S. Lee, L.H. Liaw, Y. Zhongsheng, K. Yokomori, and M.W. Berns. 2010. Analysis of DNA double-strand break response and chromatin structure in mitosis using laser microirradiation. *Nucleic Acids Res.* 38:e202. <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkq836>
- Harris, L., J. Davenport, G. Neale, and R. Goorha. 2005. The mitotic checkpoint gene BubR1 has two distinct functions in mitosis. *Exp. Cell Res.* 308:85–100. <http://dx.doi.org/10.1016/j.yexcr.2005.03.036>
- Hengeveld, R.C., H.R. de Boer, P.M. Schoonen, E.G. de Vries, S.M. Lens, and M.A. van Vugt. 2015. Rif1 is required for resolution of ultrafine DNA bridges in anaphase to ensure genomic stability. *Dev. Cell.* 34:466–474. <http://dx.doi.org/10.1016/j.devcel.2015.06.014>
- Huang, J., and J.W. Raff. 1999. The disappearance of cyclin B at the end of mitosis is regulated spatially in *Drosophila* cells. *EMBO J.* 18:2184–2195. <http://dx.doi.org/10.1093/emboj/18.8.2184>
- Huang, J.Y., and J.W. Raff. 2002. The dynamic localisation of the *Drosophila* APC/C: evidence for the existence of multiple complexes that perform distinct functions and are differentially localised. *J. Cell. Sci.* 115:2847–2856.
- Jackson, S.P., and J. Bartek. 2009. The DNA-damage response in human biology and disease. *Nature.* 461:1071–1078. <http://dx.doi.org/10.1038/nature08467>
- Jessulat, M., R.H. Maltby, D.H. Nguyen-Tran, V. Deinekou, H. Aoki, J. Vlasblom, K. Omid, K. Jin, Z. Minic, M. Hooshyar, et al. 2015. Spindle checkpoint factors Bub1 and Bub2 promote DNA double-strand break repair by nonhomologous end joining. *Mol. Cell. Biol.* 35:2448–2463. <http://dx.doi.org/10.1128/MCB.00007-15>
- Jose, M., S. Tollis, D. Nair, R. Mitteau, C. Velours, A. Massoni-Laporte, A. Royou, J.B. Sibarita, and D. McCusker. 2015. A quantitative imaging-based screen reveals the exocyst as a network hub connecting endocytosis and exocytosis. *Mol. Biol. Cell.* 26:2519–2534. <http://dx.doi.org/10.1091/mbc.E14-11-1527>
- Karess, R.E., K. Wassmann, and Z. Rahmani. 2013. New insights into the role of BubR1 in mitosis and beyond. *Int. Rev. Cell. Mol. Biol.* 306:223–273. <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-407694-5.00006-7>
- Kaye, J.A., J.A. Melo, S.K. Cheung, M.B. Vaze, J.E. Haber, and D.P. Toczyski. 2004. DNA breaks promote genomic instability by impeding proper chromosome segregation. *Curr. Biol.* 14:2096–2106. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cub.2004.10.051>
- Kim, E.M., and D.J. Burke. 2008. DNA damage activates the SAC in an ATM/ATR-dependent manner, independently of the kinetochore. *PLoS Genet.* 4:e1000015. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pgen.1000015>
- King, E.M., S.J. van der Sar, and K.G. Hardwick. 2007. Mad3 KEN boxes mediate both Cdc20 and Mad3 turnover, and are critical for the spindle checkpoint. *PLoS One.* 2:e342. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0000342>
- Kiyomitsu, T., C. Obuse, and M. Yanagida. 2007. Human Blinkin/AF15q14 is required for chromosome alignment and the mitotic checkpoint through direct interaction with Bub1 and BubR1. *Dev. Cell.* 13:663–676. <http://dx.doi.org/10.1016/j.devcel.2007.09.005>
- Kiyomitsu, T., H. Murakami, and M. Yanagida. 2011. Protein interaction domain mapping of human kinetochore protein Blinkin reveals a consensus motif for binding of spindle assembly checkpoint proteins Bub1 and BubR1. *Mol. Cell. Biol.* 31:998–1011. <http://dx.doi.org/10.1128/MCB.00815-10>
- Krenn, V., A. Wehenkel, X. Li, S. Santaguida, and A. Musacchio. 2012. Structural analysis reveals features of the spindle checkpoint kinase Bub1-kinetochore subunit Knl1 interaction. *J. Cell Biol.* 196:451–467. <http://dx.doi.org/10.1083/jcb.201110013>
- Kruse, T., G. Zhang, M.S. Larsen, T. Lischetti, W. Streicher, T. Kragh Nielsen, S.P. Bjørn, and J. Nilsson. 2013. Direct binding between BubR1 and B56-PP2A phosphatase complexes regulate mitotic progression. *J. Cell Sci.* 126:1086–1092. <http://dx.doi.org/10.1242/jcs.122481>
- Kulukian, A., J.S. Han, and D.W. Cleveland. 2009. Unattached kinetochores catalyze production of an anaphase inhibitor that requires a Mad2 template to prime Cdc20 for BubR1 binding. *Dev. Cell.* 16:105–117. <http://dx.doi.org/10.1016/j.devcel.2008.11.005>
- Larsen, N.A., J. Al-Bassam, R.R. Wei, and S.C. Harrison. 2007. Structural analysis of Bub3 interactions in the mitotic spindle checkpoint. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 104:1201–1206. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0610358104>
- Linding, R., R.B. Russell, V. Neduva, and T.J. Gibson. 2003. GlobPlot: Exploring protein sequences for globularity and disorder. *Nucleic Acids Res.* 31:3701–3708. <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkg519>
- Liu, Y., C.F. Nielsen, Q. Yao, and I.D. Hickson. 2014. The origins and processing of ultra fine anaphase DNA bridges. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 26:1–5. <http://dx.doi.org/10.1016/j.gde.2014.03.003>
- Logarinho, E., H. Bousbaa, J.M. Dias, C. Lopes, I. Amorim, A. Antunes-Martins, and C.E. Sunkel. 2004. Different spindle checkpoint proteins monitor microtubule attachment and tension at kinetochores in *Drosophila* cells. *J. Cell Sci.* 117:1757–1771. <http://dx.doi.org/10.1242/jcs.01033>
- Lopes, C.S., P. Sampaio, B. Williams, M. Goldberg, and C.E. Sunkel. 2005. The *Drosophila* Bub3 protein is required for the mitotic checkpoint and for normal accumulation of cyclins during G2 and early stages of mitosis. *J. Cell Sci.* 118:187–198. <http://dx.doi.org/10.1242/jcs.01602>
- Mari, P.O., B.I. Florea, S.P. Persengiev, N.S. Verkaik, H.T. Brüggewirth, M. Modesti, G. Giglia-Mari, K. Bezstarosti, J.A. Demmers, T.M. Luijck, et al. 2006. Dynamic assembly of end-joining complexes requires interaction between Ku70/80 and XRCC4. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 103:18597–18602. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0609061103>
- Melo, J., and D. Toczyski. 2002. A unified view of the DNA-damage checkpoint. *Curr. Opin. Cell Biol.* 14:237–245. [http://dx.doi.org/10.1016/S0955-0674\(02\)00312-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0955-0674(02)00312-5)
- 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.* 15:2809–2821.
- Mikhailov, A., R.W. Cole, and C.L. Rieder. 2002. DNA damage during mitosis in human cells delays the metaphase/anaphase transition via the spindle-assembly checkpoint. *Curr. Biol.* 12:1797–1806. [http://dx.doi.org/10.1016/S0960-9822\(02\)01226-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0960-9822(02)01226-5)
- Musarò, M., L. Ciapponi, B. Fasulo, M. Gatti, and G. Cenci. 2008. Unprotected *Drosophila melanogaster* telomeres activate the spindle assembly checkpoint. *Nat. Genet.* 40:362–366. <http://dx.doi.org/10.1038/ng.2007.64>
- Orthwein, A., A. Fradet-Turcotte, S.M. Noordermeer, M.D. Canny, C.M. Brun, J. Strecker, C. Escibano-Diaz, and D. Durocher. 2014. Mitosis inhibits DNA double-strand break repair to guard against telomere fusions. *Science.* 344:189–193. <http://dx.doi.org/10.1126/science.1248024>
- Peterson, S.E., Y. Li, B.T. Chait, M.E. Gottesman, R. Baer, and J. Gautier. 2011. Cdk1 uncouples CtIP-dependent resection and Rad51 filament formation

- during M-phase double-strand break repair. *J. Cell Biol.* 194:705–720. <http://dx.doi.org/10.1083/jcb.201103103>
- Raff, J.W., K. Jeffers, and J.Y. Huang. 2002. The roles of Fzy/Cdc20 and Fzr/Cdh1 in regulating the destruction of cyclin B in space and time. *J. Cell Biol.* 157:1139–1149. <http://dx.doi.org/10.1083/jcb.200203035>
- Rahmani, Z., M.E. Gagou, C. Lefebvre, D. Emre, and R.E. Karess. 2009. Separating the spindle, checkpoint, and timer functions of BubR1. *J. Cell Biol.* 187:597–605. <http://dx.doi.org/10.1083/jcb.200905026>
- Rong, Y.S., S.W. Titen, H.B. Xie, M.M. Golic, M. Bastiani, P. Bandyopadhyay, B.M. Olivera, M. Brodsky, G.M. Rubin, and K.G. Golic. 2002. Targeted mutagenesis by homologous recombination in *D. melanogaster*. *Genes Dev.* 16:1568–1581. <http://dx.doi.org/10.1101/gad.986602>
- Royou, A., H. Macias, and W. Sullivan. 2005. The *Drosophila* Grp/Chk1 DNA damage checkpoint controls entry into anaphase. *Curr. Biol.* 15:334–339. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cub.2005.02.026>
- Royou, A., M.E. Gagou, R. Karess, and W. Sullivan. 2010. BubR1- and Polo-coated DNA tethers facilitate poleward segregation of acentric chromatids. *Cell.* 140:235–245. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2009.12.043>
- Schittenhelm, R.B., S. Heeger, F. Althoff, A. Walter, S. Heidmann, K. Mechtler, and C.F. Lehner. 2007. Spatial organization of a ubiquitous eukaryotic kinetochore protein network in *Drosophila* chromosomes. *Chromosoma.* 116:385–402. <http://dx.doi.org/10.1007/s00412-007-0103-y>
- Schittenhelm, R.B., R. Chaleckis, and C.F. Lehner. 2009. Intrakinetochore localization and essential functional domains of *Drosophila* Spc105. *EMBO J.* 28:2374–2386. <http://dx.doi.org/10.1038/emboj.2009.188>
- Sczaniecka, M., A. Feoktistova, K.M. May, J.S. Chen, J. Blyth, K.L. Gould, and K.G. Hardwick. 2008. The spindle checkpoint functions of Mad3 and Mad2 depend on a Mad3 KEN box-mediated interaction with Cdc20-anaphase-promoting complex (APC/C). *J. Biol. Chem.* 283:23039–23047. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M803594200>
- Shepherd, L.A., J.C. Meadows, A.M. Sochaj, T.C. Lancaster, J. Zou, G.J. Buttrick, J. Rappsilber, K.G. Hardwick, and J.B. Millar. 2012. Phosphodependent recruitment of Bub1 and Bub3 to Spc7/KNL1 by Mph1 kinase maintains the spindle checkpoint. *Curr. Biol.* 22:891–899. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cub.2012.03.051>
- Silva, B.A., J.R. Stambaugh, K. Yokomori, J.V. Shah, and M.W. Berns. 2014. DNA damage to a single chromosome end delays anaphase onset. *J. Biol. Chem.* 289:22771–22784. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M113.535955>
- Silva, E., S. Tiong, M. Pedersen, E. Homola, A. Royou, B. Fasulo, G. Siriaco, and S.D. Campbell. 2004. ATM is required for telomere maintenance and chromosome stability during *Drosophila* development. *Curr. Biol.* 14:1341–1347. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cub.2004.06.056>
- Sudakin, V., G.K. Chan, and T.J. Yen. 2001. Checkpoint inhibition of the APC/C in HeLa cells is mediated by a complex of BUBR1, BUB3, CDC20, and MAD2. *J. Cell Biol.* 154:925–936. <http://dx.doi.org/10.1083/jcb.200102093>
- Suijkerbuijk, S.J., M. Vleugel, A. Teixeira, and G.J. Kops. 2012. Integration of kinase and phosphatase activities by BUBR1 ensures formation of stable kinetochore-microtubule attachments. *Dev. Cell.* 23:745–755. <http://dx.doi.org/10.1016/j.devcel.2012.09.005>
- Talbert, P.B., K. Ahmad, G. Almouzni, J. Ausió, F. Berger, P.L. Bhalla, W.M. Bonner, W.Z. Cande, B.P. Chadwick, S.W. Chan, et al. 2012. A unified phylogeny-based nomenclature for histone variants. *Epigenetics Chromatin.* 5:7. <http://dx.doi.org/10.1186/1756-8935-5-7>
- Taylor, S.S., E. Ha, and F. McKeon. 1998. The human homologue of Bub3 is required for kinetochore localization of Bub1 and a Mad3/Bub1-related protein kinase. *J. Cell Biol.* 142:1–11. <http://dx.doi.org/10.1083/jcb.142.1.1>
- Tian, W., B. Li, R. Warrington, D.R. Tomchick, H. Yu, and X. Luo. 2012. Structural analysis of human Cdc20 supports multisite degron recognition by APC/C. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 109:18419–18424. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1213438109>
- Wang, X., J.R. Babu, J.M. Harden, S.A. Jablonski, M.H. Gazi, W.L. Lingle, P.C. de Groen, T.J. Yen, and J.M. van Deursen. 2001. The mitotic checkpoint protein hBUB3 and the mRNA export factor hRAE1 interact with GLE2p-binding sequence (GLEBS)-containing proteins. *J. Biol. Chem.* 276:26559–26567. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M101083200>

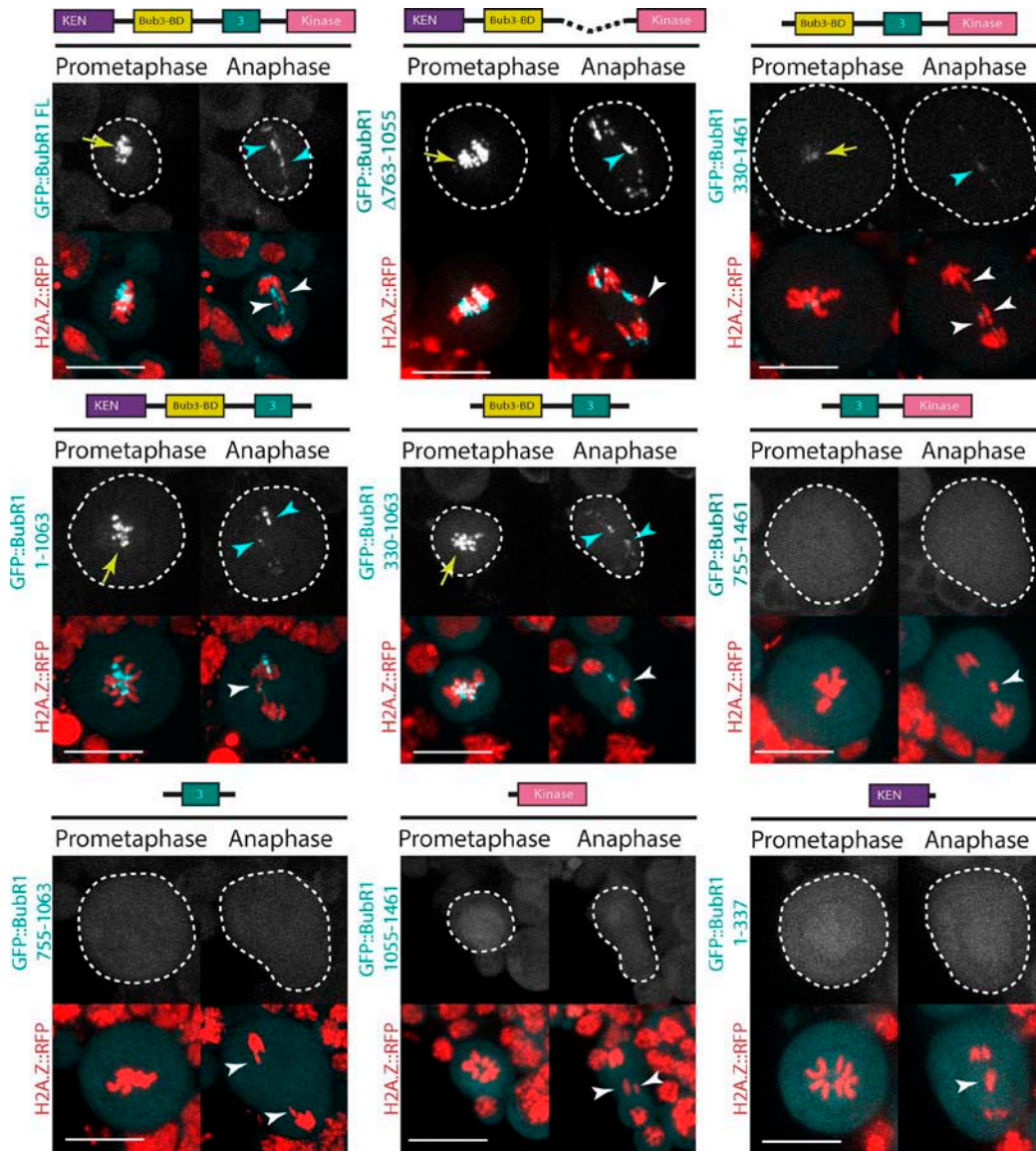
Derive et al., <http://www.jcb.org/cgi/content/full/jcb.201504059/DC1>

Figure S1. **The Bub3-BD of BubR1 is required for its localization on both the kinetochore and tether.** Time-lapse images of neuroblasts expressing H2A.Z::RFP and the indicated GFP::BubR1 truncated construct after I-CreI expression. The kinetochore and tether localizations of the GFP::BubR1 constructs are indicated with yellow arrows and cyan arrowheads, respectively. The white arrowheads point to the I-CreI-induced acentric chromatids. The cells are delineated with dotted lines. Bars, 10  $\mu$ m.

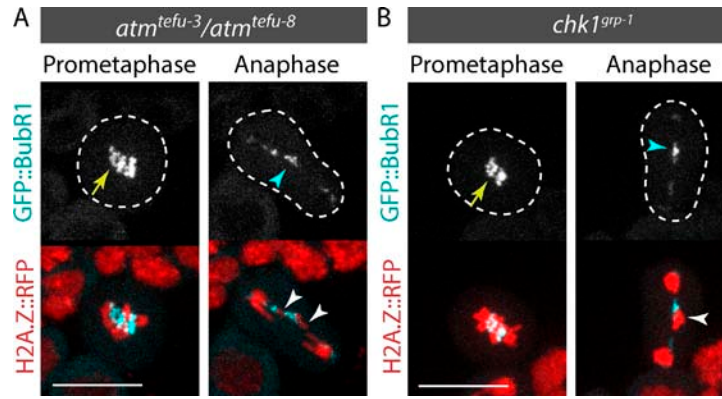


Figure S2. **The DNA damage checkpoint kinases Chk1 and ATM are not required for BubR1 recruitment to DNA breaks.** Time-lapse images of *atm<sup>tefu-3</sup>/atm<sup>tefu-8</sup>* and *chk1<sup>grp-1</sup>* mutant neuroblasts expressing I-Crel and labeled with H2A.Z::RFP and GFP::BubR1. The yellow arrows indicate the localization of GFP::BubR1 on the kinetochore during prometaphase. The cyan arrowheads point to the GFP::BubR1 signal on the tether. The white arrowheads designate the broken chromatids. The cells are delineated with dotted lines. Bars, 10  $\mu$ m.

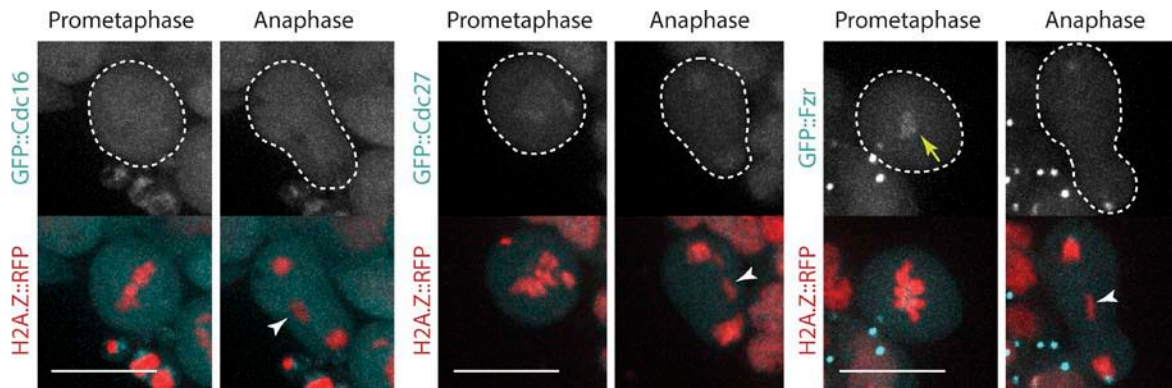


Figure S3. **The APC/C subunits Cdc16, Cdc27, and cofactor Fzr do not localize on DNA breaks.** Time-lapse images of neuroblasts expressing H2A.Z::RFP and GFP::Cdc16, GFP::Cdc27, and GFP::Fzr (left, middle, and right) after I-Crel expression. The white arrowheads point to the broken chromatids. The yellow arrow indicates the localization of GFP::Fzr on the kinetochore during prometaphase. The cells are delineated with dotted lines. Bars, 10  $\mu$ m.

A

```

Human Cdc20  S L P D R I L D A P E I R N D Y Y L N L V D W S S G N V L A V
Fruitfly Fzy  T T S E R I L D A P D F I N D Y Y L N L M D W S A D N I V A V
Fzy-DYY*    T T S E R I L D A P D F I N A A A L N L M D W S A D N I V A V
    
```

B

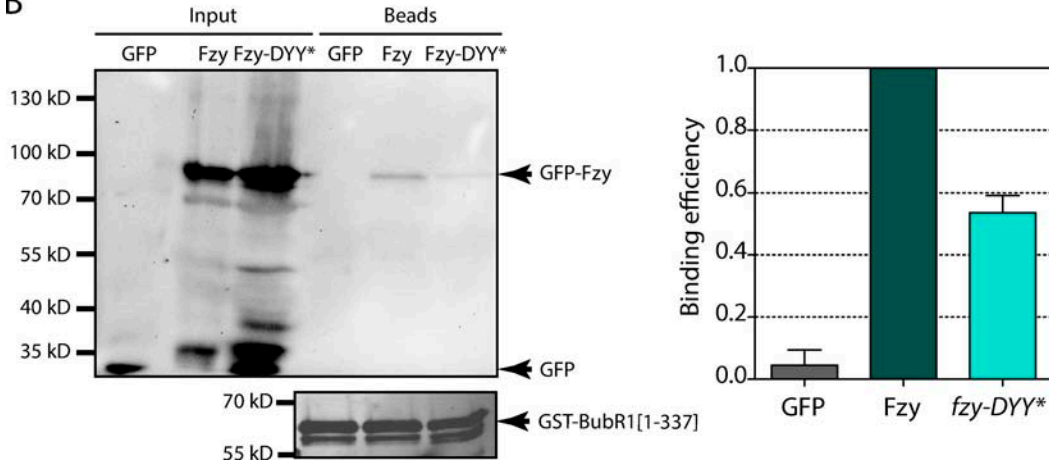
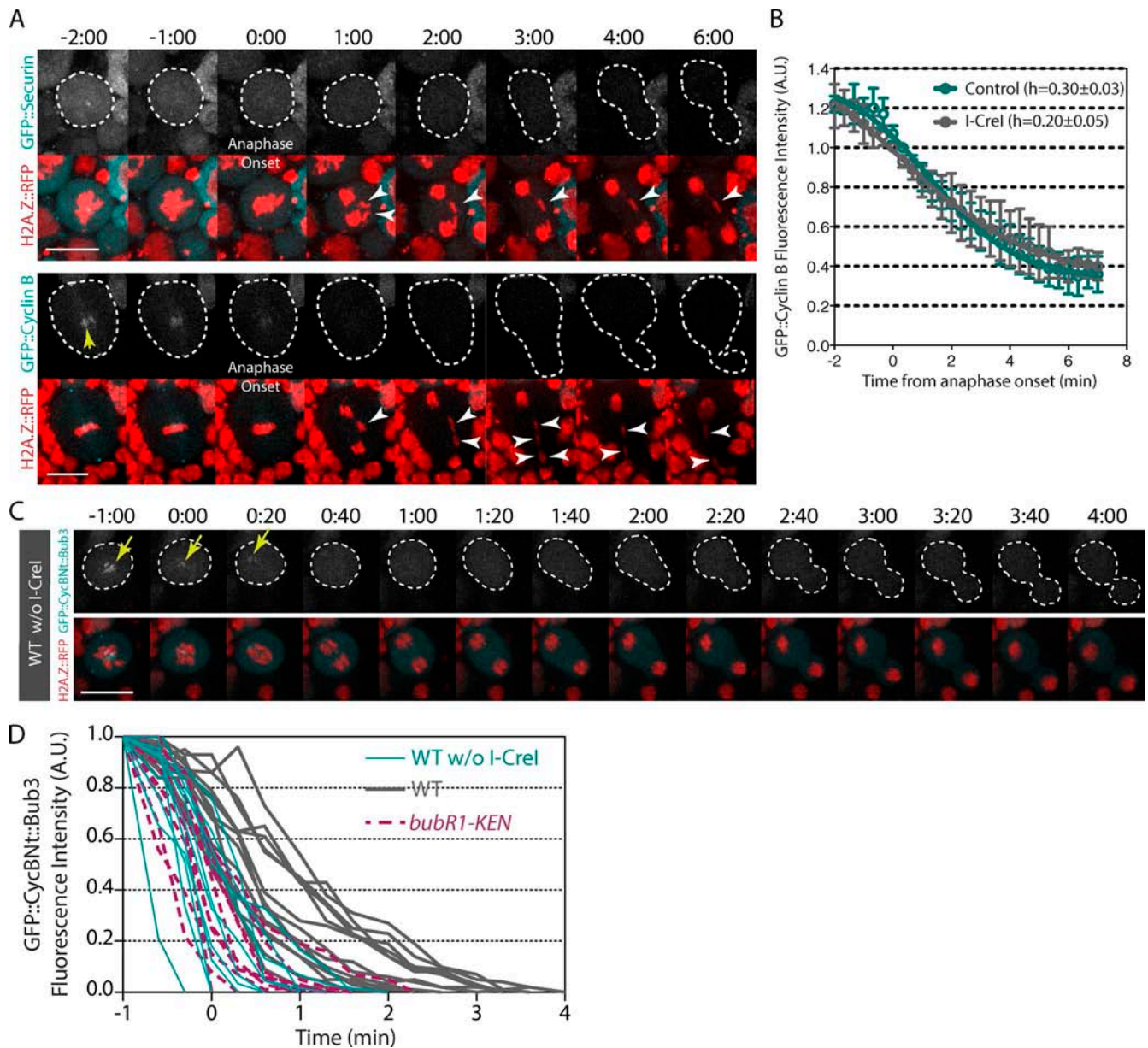


Figure S4. **The substitution of D210, Y211, and Y212 by alanine affects Fzy association with BubR1 N-terminal sequence.** (A) Sequence alignment of human Cdc20 and fruit fly Fzy around the DYY residues, which have been identified in human Cdc20 as essential for Cdc20 interaction with the first KEN box of human BubR1. These residues correspond to D210, Y211, and Y212 in *Drosophila* Fzy. We mutated these three residues into alanine and called the resulted mutant Fzy-DYY\*. (B) Western blot showing the in vitro pull-down of GFP, GFP::Fzy (Fzy), and GFP::Fzy-DYY\* (Fzy-DYY\*) with GST::BubR1 [1–337]. The first three lanes show the level of GFP-labeled proteins extracted from embryos (Input). The last three lanes show the level of GFP-labeled proteins bound to the beads. The histogram corresponds to the binding efficiency of GFP and Fzy-DYY\* to GST::BubR1 [1–337] relative to Fzy from three independent experiments.





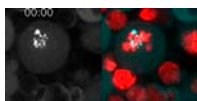
**Figure S5. The dynamics of GFP::Securin and GFP::Cyclin B during anaphase after I-Crel expression.** (A and B) Securin and Cyclin B do not localize on the broken chromatids throughout mitosis. (A) Time-lapse images of neuroblasts expressing I-Crel and labeled with H2A.Z::RFP and GFP::Securin (top) or GFP::Cyclin B (bottom). The kinetochore localization of GFP::Cyclin B is indicated with a yellow arrow. The white arrowheads point to the I-Crel-induced acentric chromatids. The cells are delineated with white dotted lines. Time (given in minutes/seconds) 0:00 corresponds to anaphase onset. Bars, 10  $\mu$ m. (B) Quantitative analysis of the disappearance of the GFP::Cyclin B signal in control cells and in cells expressing I-Crel. The graph shows the average fluorescence intensities of GFP signals over time every 20 s. The fluorescence intensities were normalized with the fluorescence intensity measured at anaphase onset. (C and D) The APC/C synthetic substrate GFP::CycBNt::Bub3 is maintained on the tether during early anaphase in a BubR1 KEN box-dependent manner. (C) Time-lapse images of a WT cell expressing GFP::CycBNt::Bub3 without I-Crel induction (WT no HS). GFP::CycBNt::Bub3 localizes on the kinetochore during metaphase (yellow arrows). Upon anaphase onset, the GFP::CycBNt::Bub3 signal disappears from the kinetochore within 40 s. Time 0:00 corresponds to anaphase onset. (D) Quantitative analysis of the disappearance of the GFP::CycBNt::Bub3 signal on the kinetochore and tether for WT without I-Crel induction (WT no HS), WT, and *bubR1-KEN* mutant cells after I-Crel induction. The graph shows the fluorescence intensities of GFP signals on kinetochores and tethers over time for each cell. The fluorescence intensities were normalized with the fluorescence intensity measured at the time point -1:00 min. The GFP signal was measured over time every 20 s. The time starts at anaphase onset. This figure shows the raw data of Fig. 6 C for WT and *bubR1-KEN* mutant after I-Crel induction. Error bars represent mean  $\pm$  95% confidence interval. A.U., arbitrary units.

Table S1. Genotypes of the larvae used for each figure

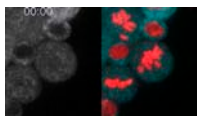
Genotype	Short name	Figure
$y^1w^{1,118}; bubR1^1/bubR1^1; p[w^+, ubi>EGFP::BubR1 \text{ truncated}]/ p[w^+, H2A.Z::mRFP], p[v^+, hsp70>I-Crel]$	BubR1	1 and S1
$y^1w^{1,118}; +; p[w^+, ubi>EGFP::BubR1 \text{ 330-762[E481K]}]/ p[w^+, H2A.Z::mRFP], p[v^+, hsp70>I-Crel]$	330–762 [E481K]	1
$y^1w^{1,118}; +; p[w^+, H2A.Z::EGFP], p[v^+, hsp70>I-Crel]/ p[w^+, bub3>mRFP::Bub3]$	RFP::Bub3 H2A.Z::GFP	2 A
$y^1w^{1,118}; bubR1^1/bubR1^1; p[w^+, bub3>mRFP::Bub3]/ p[w^+, H2A.Z::EGFP], p[v^+, hsp70>I-Crel]$	<i>bubR1</i> <sup>1</sup>	2 B
$y^1w^{1,118}; p[w^+, bubR1>EGFP::BubR1], p[v^+, hsp70>I-Crel]/ +; p[w^+, H2A.Z::mRFP]/ +; bub3^1/ bub3^1$	<i>bub3</i> <sup>1</sup>	2 C
$y^1w^{1,118}; p[w^+, bub3>EGFP::Bub3]/ +; p[w^+, H2A.Z::mRFP]/ +$	GFP::Bub3 H2A.Z::RFP	2 D
$y^1w^{1,118}; p[w^+, bubR1>EGFP::BubR1]/ y^1w^{1,118}; +; p[w^+, H2A.Z::mRFP]/ +$	GFP::BubR1 H2A.Z::RFP	2 E
$y^1w^{1,118}; +; p[w^+, H2A.Z::mRFP], p[v^+, hsp70>I-Crel]/ p[w^+, spc105>Spc105::EGFP]$	Spc105::GFP H2A.Z::RFP	3 A
$y^1w^{1,118}; +; p[w^+, H2A.Z::mRFP], p[v^+, hsp70>I-Crel]/ p[w^+, cenpC>CenpC::EGFP]$	CenpC::GFP H2A.Z::RFP	3 B
$y^1w^{1,118}; +; p[w^+, H2A.Z::mRFP], p[v^+, hsp70>I-Crel]/ p[w^+, g>EGFP::Nuf2]$	GFP::Nuf2 H2A.Z::RFP	3 C
$y^1w^{1,118}; p[w^+, mad1>Mad1::EGFP]/ +; p[w^+, H2A.Z::mRFP], p[v^+, hsp70>I-Crel]/ +$	Mad1::GFP H2A.Z::RFP	3 D
$y^1w^{1,118}; p[w^+, bubR1>GFP::BubR1], p[v^+, hsp70>I-Crel]/ y^1w^{1,118}; +; p[w^+, H2A.Z::mRFP], mad1/ mad1$	<i>mad1</i>	3 E
$y^1w^{1,118}; p[w^+, mps1>EGFP::Mps1]/ +; p[w^+, H2A.Z::mRFP], p[v^+, hsp70>I-Crel]/ +$	GFP::Mps1 H2A.Z::RFP	3 F
$y^1w^{1,118}; p[w^+, ubi>RFP::BubR1]; mps1^1$	<i>mps1</i> <sup>1</sup>	3 G
$y^1w^{1,118}; p[w^+, ubi>GFP::BubR1-KARD-D]/ +; p[w^+, H2A.Z::mRFP], p[v^+, hsp70>I-Crel]/ +$	<i>BubR1-KARD-D</i>	3 H
$y^1w^{1,118}; p[w^+, ubi>GFP::BubR1-KARD-A]/ +; p[w^+, H2A.Z::mRFP], p[v^+, hsp70>I-Crel]/ +$	<i>BubR1-KARD-A</i>	3 I
$y^1w^{1,118}; p[w^+, ubi>EGFP::Fzy]/ +; p[w^+, H2A.Z::mRFP], p[v^+, hsp70>I-Crel]/ +$	WT	4, A–D
$y^1w^{1,118}; p[w^+, bubR1>mRFP::BubR1-KEN]; bubR1^1, p[w^+, ubi>EGFP::Fzy/bubR1^1]; p[w^+, H2A.Z::mRFP], p[v^+, hsp70>I-Crel]/ +$	<i>bubR1-KEN</i>	4, A–D
$y^1w^{1,118}; p[w^+, ubi>EGFP::Fzy-DYY*], fzy^3/ +; p[w^+, H2A.Z::mRFP], p[v^+, hsp70>I-Crel]/ +$	<i>fzy-DYY*</i>	4, A–D
$y^1w^{1,118}; +; p[w^+, H2A.Z::mRFP], p[v^+, hsp70>I-Crel]/ +$	WT	5
$y^1w^{1,118}; p[v^+, hsp70>I-Crel]/ y^1w^{1,118}; p[w^+, H2A.Z::mRFP]/ +; bub3^1/ bub3^1$	<i>bub3</i> <sup>1</sup>	5
$y^1w^{1,118}; p[w^+, bubR1>mRFP::BubR1-KEN]/ y^1w^{1,118}; p[w^+, bubR1>mRFP::BubR1-KEN]; bubR1^1/ bubR1^1; p[w^+, H2A.Z::mRFP], p[v^+, hsp70>I-Crel]/ +$	<i>bubR1-KEN(2X)</i>	5
$y^1w^{1,118}; fzy^3/ +; p[w^+, H2A.Z::mRFP], p[v^+, hsp70>I-Crel]/ +$	<i>fzy</i> <sup>3</sup> / +	5
$y^1w^{1,118}; p[w^+, ubi>EGFP::Fzy-DYY*], fzy^3/ +; p[w^+, H2A.Z::mRFP], p[v^+, hsp70>I-Crel]/ +$	<i>fzy</i> <sup>3</sup> / + <i>Fzy-DYY*</i>	5
$y^1w^{1,118}; p[w^+, ubi>EGFP::Fzy-DYY*], fzy^3/ p[w^+, ubi>EGFP::Fzy-DYY*]; p[w^+, H2A.Z::mRFP], p[v^+, hsp70>I-Crel]/ +$	<i>fzy</i> <sup>3</sup> / + <i>Fzy-DYY*</i> (2X)	5
$y^1w^{1,118}; p[w^+, H2A.Z::mRFP], p[v^+, hsp70>I-Crel]/ p[w^+, ubi>EGFP::CycBNt::Bub3]$	WT	6
$y^1w^{1,118}; p[w^+, bubR1>mRFP::BubR1::KEN]; bubR1^1/bubR1^1; p[w^+, H2A.Z::mRFP], p[v^+, hsp70>I-Crel]/ p[w^+, ubi>EGFP::CycBNt::Bub3]$	<i>bubR1-KEN</i>	6
$y^1w^{1,118}; p[w^+, bubR1>GFP::BubR1], p[v^+, hsp70>I-Crel]/ +; p[w^+, H2A.Z::mRFP]/ +; tefu^{atm-3}/tefu^{atm-8}$	<i>atm</i> <sup>tefu-3</sup> / <i>atm</i> <sup>tefu-8</sup>	S2
$y^1w^{1,118}; p[w^+, bubR1>GFP::BubR1]/ +; chk1^{grp-1}; p[w^+, H2A.Z::mRFP], p[v^+, hsp70>I-Crel]/ +$	<i>chk1</i> <sup>grp-1</sup>	S2
$y^1w^{1,118}; p[w^+, ubi>GFP::Cdc16]/ p[w^+, H2A.Z::mRFP], p[v^+, hsp70>I-Crel]$	GFP::Cdc16 H2A.Z::RFP	S3
$y^1w^{1,118}; +; p[w^+, ubi>GFP::Cdc27]/ p[w^+, H2A.Z::mRFP], p[v^+, hsp70>I-Crel]$	GFP::Cdc27 H2A.Z::RFP	S3
$y^1w^{1,118}; +; p[w^+, ubi>GFP::Fzr]/ p[w^+, H2A.Z::mRFP], p[v^+, hsp70>I-Crel]$	GFP::Fzr H2A.Z::RFP	S3
$y^1w^{1,118}; p[w^+, ubi>EGFP]/ CyOy+$	GFP	S4
$y^1w^{1,118}; p[w^+, ubi>EGFP::Fzy], fzy^3/ CyOy+$	Fzy	S4
$y^1w^{1,118}; p[w^+, ubi>EGFP::Fzy-DYY*], fzy^3/ CyOy+$	<i>fzy-DYY*</i>	S4
$y^1w^{1,118}; p[w^+, H2A.Z::mRFP], p[v^+, hsp70>I-Crel]/ p[w^+, Ub>EGFP::Securin]$	GFP::Securin H2A.Z::RFP	S5 A
$yw; p[w^+, Ub>EGFP::Cyclin B]/ +; p[w^+, H2A.Z::mRFP], p[v^+, hsp70>I-Crel]/ +$	GFP::CyclinB H2A.Z::RFP	S5, A and B
$yw; p[w^+, Ub>EGFP::Cyclin B]/ +; p[w^+, H2A.Z::mRFP], p[v^+, hsp70>I-Crel]/ +$ no heat shocked and $yw; p[w^+, Ub>EGFP::Cyclin B]/ +; p[w^+, H2A.Z::mRFP]$ heat shocked	Control	S5 B
$yw; p[w^+, Ub>EGFP::Cyclin B]/ +; p[w^+, H2A.Z::mRFP], p[v^+, hsp70>I-Crel]/ +$	I-Crel	S5 B
$yw; p[w^+, H2A.Z::mRFP], p[v^+, hsp70>I-Crel]/ p[w^+, Ub>EGFP::CycBNt::Bub3]$	WT No HS	S5, C and D

Table S2. Oligonucleotide sequences used in this study

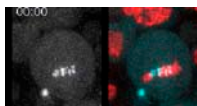
Oligonucleotide	Sequence (5' to 3')	Construct
F1	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCGACTTTGACAATGCGAAAGAG	BubR1 FL [1–1,063] [1–337] [Δ763–1,055] BubR1-KARD-D BubR1-KARD-A
F2	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCGACGAACAAGCAATGCCACCTATT	[330–1,063] [330–762]
F3	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCCCGGGTGGTGACAACCTTTTGGCG	[755–1,461] [755–1,063]
F4	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTATAAAAAATCCACACTGCTGATC	[1,055–1,461]
R1	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGTCTATTTCTGCAATATCGTGTTAAACTT	BubR1 FL [755–1,461] [1,055–1,461] [Δ763–1,055] BubR1-KARD-D BubR1-KARD-A
R2	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGTTCGATCAGCAGTGTGGAATTTTTTAT	[1–1,063] [330–1,063] [755–1,063]
R3	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGTCTAAATAGGTGGCATTGCTTGTTCGTC	[1–337]
R4	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGTTCGCGCAAAAAGTTGTACCACCCGG	[330–762]
Δ3NtR	AGGGATCAGCAGTGTGGAATTTTTTATGCGCAAAAAGTTGTACCACCCGG	[Δ763–1,055]
Δ3CTF	GAAAAACCGGGTGGTGACAACCTTTTTCGCATAAAAAATCCACACTGCTGATC	[Δ763–1,055]
CycBNt-Gat-F	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCGACGAACAAGCAATGCCACCTATTGGCGCCGAGCTGGCGCC GGAGCGATGGCCGCCCTTGAAAAGAAC	Ub>EGFP-CycBNt-Bub3
Bub3-Lnk-CycBNt-R	TGGGGACGCGCTCCGGCGCCAGCTCCGGCGCCGCCAGTGCTGTTTCTTCCA	Ub>EGFP-CycBNt-Bub3
Lnk-Bub3-F	GGCGCCGAGCTGGCGCCGGAGCGCTCCCCAGAGTTCAAGCTTA	Ub>EGFP-CycBNt-Bub3
Bub3-R	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGTCTATTTATTTCTGTTTAGTTTCTCGTC	Ub>EGFP-CycBNt-Bub3
Bub3prom-F	ACTGGGTACCGATCTTCTGACGGTGCCTCACCTGGAG	g>mRFP-Bub3
Bub3prom-R	ACTGCTCGAGTTTGTCAAGTTTCTGACGCAACTTG	g>mRFP-Bub3
Bub3gen-F	AGCTCCCGGATGCGTCCCCAGAGTTCAAGCTTAAC	g>mRFP-Bub3
Bub3gen-R	CTATTCTAGAAAAAGCCAGGTTTATTATGGCCAACG	g>mRFP-Bub3
mRFP-F	ACTGCTCGAGATGGCTCCTCCGAGGACGTC	g>mRFP-Bub3
mRFP-R	ACTCCCGGGCGCTCCGGCGCCAGCTCCGGCGCCCTAGGGCGCCGGTGGAGTGGCGCCCTCG	g>mRFP-Bub3
KARD-R(D)	GGTACCGCTCGTCCCAAGCTTTGATCCCGTGCTCATCGGTTTCCAATATGGTATCTAGTTGCTTTCCGAAA GTTGGAGA	BubR1-KARD-D
KARD-R(A)	GGTACCGCTCGTCCCAAGCTTTGTCGCGGTGCTCAGCGTTTCCAATATGGTAGCTAGTTGCTTTCCGAAA GTTGGAGA	BubR1-KARD-A
KARD-F(D)	TCTCCAACCTTGGCAAAGCACTAGATACCATATTGAAACCGATGAGCAGCGGATCAAAGCTTGGCGACGA CGGGTACC	BubR1-KARD-D
KARD-F(A)	TCTCCAACCTTGGCAAAGCACTAGTACCATATTGAAACCGCTGAGCAGCGGACAAAGCTTGGCGACGA CGGGTACC	BubR1-KARD-A
Securin-Nt-F	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCGATCAGATTTTAAACAAGGAAA	Ub>EGFP-Securin
Securin-Nt-R	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGTCTAAAATAGAATCAATGCCTTCCAA	Ub>EGFP-Securin
Securin-Ct-F	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCATGGATCAGATTTTAAACAAGGAAA	Ub>Securin-EGFP
Securin-Ct-R	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGTCAAATAGAATCAATGCCTTCCAA	Ub>Securin-EGFP



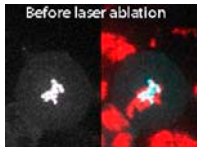
Video 1. **The BubR1-truncated construct 330–762 containing the Bub3-BD and fused with GFP localizes on I-Crel-induced DNA breaks during mitosis.** WT neuroblast expressing GFP::BubR1 330–762 (left, cyan on right) and H2A.Z::RFP (red) after I-Crel induction. Images were analyzed by a time-lapse confocal spinning disk microscope equipped with an Evolve emCCD camera. Frames were taken every 20 s. Time is given in minutes/seconds. The video corresponds to Fig. 1 C (left).



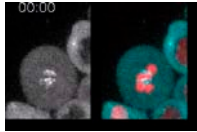
Video 2. **The BubR1 truncated construct 330–762 mutated on E481 does not localize on DNA breaks during mitosis.** WT neuroblast expressing GFP::BubR1 330–762 [E481K] (left, cyan on right) and H2A.Z::RFP (red) after I-Crel induction. Images were analyzed by a time-lapse confocal spinning disk microscope equipped with an Evolve emCCD camera. Frames were taken every 20 s. Time is given in minutes/seconds. The video corresponds to Fig. 1 C (right).



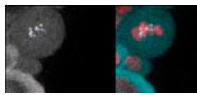
Video 3. **Bub3 localizes on I-Crel-induced DNA breaks.** WT neuroblast expressing RFP::Bub3 (left, cyan on right) and H2A.Z::GFP (red) after I-Crel induction. Images were analyzed by a time-lapse confocal spinning disk microscope equipped with an Evolve emCCD camera. Frames were taken every 20 s. Time is given in minutes/seconds. The video corresponds to Fig. 2 A (left).



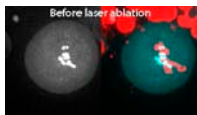
Video 4. **BubR1 localizes on laser-induced DNA breaks.** WT neuroblast expressing GFP::BubR1 (left, cyan on right) and H2A.Z::RFP (red). Image acquisition starts 20s before laser ablation, and the acquisition is paused while inducing chromosome breaks with a 355-nm pulsed laser and starts again. The arrows indicate the appearance of GFP::Bub3 signal on the breaks. Images were analyzed by a time-lapse confocal spinning disk microscope equipped with an Evolve emCCD camera. Frames were taken every 20 s. Time is given in minutes/seconds. The video corresponds to Fig. 2 E.



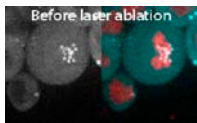
Video 5. **Fzy localizes on I-Crel-induced DNA breaks.** WT neuroblast expressing GFP::Fzy (left, cyan on right) and H2A.Z::RFP (red) after I-Crel induction. Images were analyzed by a time-lapse confocal spinning disk microscope equipped with an Evolve emCCD camera. Frames were taken every 20 s. Time is given in minutes/seconds. The video corresponds to Fig. 4 A (left).



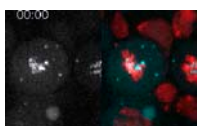
Video 6. **Fzy levels are reduced on I-Crel-induced DNA breaks in *bubR1-KEN* mutant.** *bubR1-KEN* mutant neuroblast expressing GFP::Fzy (left, cyan on right) and H2A.Z::RFP (red) after I-Crel induction. Images were analyzed by a time-lapse confocal spinning disk microscope equipped with an Evolve emCCD camera. Frames were taken every 20 s. Time is given in minutes/seconds. The video corresponds to Fig. 4 A (middle).



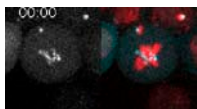
Video 7. **Fzy localizes on laser-induced DNA breaks.** WT neuroblast expressing GFP::Fzy (left, cyan on right) and H2A.Z::RFP (red) before and after laser-induced DNA breaks. The yellow circle indicates the site of laser ablation. The arrows indicate the appearance of GFP::Fzy signal on the breaks. Images were analyzed by a time-lapse confocal spinning disk microscope equipped with an Evolve emCCD camera. Frames were taken every 20 s. Time is given in minutes/seconds. The video corresponds to Fig. 4 B (top).



Video 8. **Fzy levels are reduced on laser-induced DNA breaks in *bubR1-KEN* mutant.** *bubR1-KEN* mutant neuroblast expressing GFP::Fzy (left, cyan on right) and H2A.Z::RFP (red) before and after laser-induced DNA breaks. The yellow circle indicates the site of laser ablation. Images were analyzed by a time-lapse confocal spinning disk microscope equipped with an Evolve emCCD camera. Frames were taken every 20 s. Time is given in minutes/seconds. The video corresponds to Fig. 4 B (middle).



Video 9. **The degradation of the synthetic APC/C substrate CycBNt::Bub3 is delayed on DNA breaks.** WT neuroblast expressing GFP::CycBNt::Bub3 (left, cyan on right) and H2A.Z::RFP (red) after I-Crel expression. Images were analyzed by a time-lapse confocal spinning disk microscope equipped with an Evolve emCCD camera. Frames were taken every 20 s. Time is given in minutes/seconds. The video corresponds to Fig. 6 B (top).



Video 10. **The degradation of the synthetic APC/C substrate CycBNt::Bub3 is not delayed on DNA breaks in *bubR1-KEN* mutant.** *bubR1-KEN* mutant neuroblast expressing GFP::CycBNt::Bub3 (left, cyan on right) and H2A.Z::RFP (red) after I-Crel expression. Images were analyzed by a time-lapse confocal spinning disk microscope equipped with an Evolve emCCD camera. Frames were taken every 20 s. Time is given in minutes/seconds. The video corresponds to Fig. 6 B (bottom).

## II. Article 2 : Mre11-Rad50-Nbs1 and ATM mediate the robust recruitment of Polo and BubR1/ Bub3 to DNA breaks during mitosis

**Résumé :** La présence de lésions au niveau de l'ADN, comme les cassures doubles brin (DSB ou double strand break), induit l'activation de la réponse aux dommages à l'ADN (DDR ou DNA Damage Response), qui retarde le cycle cellulaire et promeut la réparation de l'ADN. La DDR en interphase est bien documentée, mais peu de choses sont connues sur la réponse aux DSB pendant la mitose. Nous avons montré que les protéines mitotiques Polo, BubR1 et Bub3 s'accumulent sur les DSB pendant la mitose et facilitent la ségrégation du fragment de chromosome cassé. Ce mécanisme requiert la séquestration de Fizzy<sup>CDC20</sup> (Fzy) par BubR1 qui provoque une inhibition locale de l'APC/C autour de la cassure de chromosome. Afin d'avoir une meilleure compréhension du rôle de ces protéines, nous avons étudié la dynamique de Polo, BubR1, Bub3 et Fzy sur les cassures d'ADN induites par un laser UV pulsé à un instant précis pendant la mitose. Nos résultats montrent que Polo est rapidement recruté sur les cassures d'ADN et précède BubR1, Bub3 et Fzy. Alors que BubR1, Bub3 et Fzy se dissocient des DSB en fin de mitose, Polo reste sur les DSB et ne se dissocie que plus tard, pendant l'interphase. Nous avons également montré que Polo était nécessaire pour le recrutement efficace de BubR1 et Bub3 sur les DSB. Enfin, nous avons découvert que l'accumulation correcte de Polo, BubR1 et Bub3 sur les DSB en mitose dépend du complexe Mre11-Rad50-Nbs1 et de la kinase ATM (Ataxia-Telangiectasia Mutated), indépendamment de la phosphorylation de H2Az. Nos données suggèrent un modèle dans lequel les DSB en mitose sont détectées par le complexe MRN et ATM, qui favorisent le recrutement de Polo, et par conséquent, de BubR1 et Bub3 sur les DSB.



## **Mre11-Rad50-Nbs1 and ATM mediate the robust recruitment of Polo and BubR1/ Bub3 to DNA breaks during mitosis**

Landmann Cedric<sup>1</sup>, Pierre-Elies Priscillia<sup>1</sup>, Montembault Emilie<sup>1</sup>, Planchenault Yoann<sup>1</sup>, Royou Anne\*<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>CNRS-UMR5095, University of Bordeaux, IECB, 2 rue Robert Escarpit, 33607

\*Corresponding author:

email: [a.royou@iecb.u-bordeaux.fr](mailto:a.royou@iecb.u-bordeaux.fr)

phone: +33 5 40 00 6306

Fax: +33 5 40 00 3004

Keywords: Mitosis, Drosophila, DNA damage, Polo, BubR1, Bub3, ATM, Mre11, Rad50, Checkpoint, Chromosomes, anaphase, kinetochore, ACP/C, Cdc20

## Abbreviations

APC/C: anaphase promoting complex/cyclosome

ATM: ataxia-telangiectasia mutated

CDK1: cyclin-dependent kinase 1

DDR: DNA damage response

DSB: double strand break

HR: homologous recombination

NHEJ: non-homologous end joining

PIKK: phosphoinositide-3-kinase-related kinases

PLK1: polo-like kinase 1

SAC: Spindle Assembly Checkpoint



## Summary

The presence of DNA damage, such as double strand breaks (DSB), triggers the activation of the DNA damage response (DDR), which delays the cell cycle and promotes DNA repair. While the DDR is well documented in interphase, less is known about the response to DSB in mitosis. We have recently shown that the mitotic proteins Polo, BubR1 and Bub3 accumulate on DSB during mitosis and facilitate the proper segregation of the broken chromosome fragment. This requires the BubR1-mediated sequestration Fizzy<sup>Cdc20</sup> (Fzy) and subsequent local inhibition of APC/C at the site of damage. Here we examine the kinetics of Polo, BubR1, Bub3 and Fzy to DNA breaks induced by a pulsed laser at a precise time during mitosis. Our data reveal that Polo is promptly recruited to DNA breaks and precedes BubR1, Bub3 and Fzy. While BubR1, Bub3 and Fzy disassembly from DSBs coincides with mitotic exit, Polo remains on DSB well into the next interphase. We further show that Polo is required for the efficient recruitment of BubR1 and Bub3 to DNA breaks. Finally, we provide evidence that the robust accumulation of Polo, BubR1 and Bub3 to DSB in mitosis depends on the Mre11-Rad50-Nbs1 complex and the kinase ATM (Ataxia-Telangiectasia Mutated), independently of the phosphorylation of H2Az at the site of damage. Our data support a model in which DSB in mitosis are sensed and marked by the MRN complex and ATM, which in turn, facilitate the efficient recruitment of Polo and the subsequent accumulation of BubR1/Bub3 to DNA lesions.

## Introduction

During their life, cells encounter genotoxic stress from various intrinsic and extrinsic sources. DNA double strand breaks are potentially the most harmful damage as they can cause genomic instability, a hallmark of cancer cells (Jackson and Bartek, 2009). The presence of DSB in interphase triggers a conserved signaling pathway also known as the DNA Damage Response (DDR) that promotes DNA repair concomitantly with cell cycle delay via checkpoint activation (Hartlerode and Scully, 2009; Melo and Toczyski, 2002). In brief, DSB trigger the prompt accumulation of sensor proteins, the Ku70/80 heterodimer and the Mre11/Rad50/Nbs1 (MRN) complex at the site of damage, which, in turn, recruit the phosphoinositide-3-kinase-related kinases (PIKK), DNA-dependent protein kinase catalytic subunit (DNA-PKcs) and ATM respectively, via direct interactions (Falck et al., 2005). These PIKKs promote the rapid modification of chromatin flanking the breaks, including extensive phosphorylation of the histone 2A variant H2Ax ( $\gamma$ H2Ax) (Rogakou et al., 1998), which amplifies the signal at the site of damage. The signal is transduced to effectors that promote DNA repair and delay cell cycle progression. The *Drosophila* DDR pathway is similar to the canonical pathway described above; except for the DNA-PKcs, which was lost in Dipterian (Sekelsky, 2017).

Studies in vertebrates have recently shown that the presence of DSBs in mitosis activates a primary DDR, which consists of the recognition of the DNA lesions by the MRN complex and Ku70/80, followed by the partial activation of ATM and subsequent H2Ax phosphorylation on chromatin proximal to the breaks (Giunta et al., 2010; Gomez-Godinez et al., 2010). This is followed by an inhibition of the downstream signaling pathway that promotes DNA repair by non-homologous end joining or homologous recombination (the two main repair pathways) until the next G1 phase (Giunta et al., 2010; Orthwein et al., 2014; Peterson et al., 2011; Terasawa et al., 2014). This inhibition is thought to depend on CDK1 and PLK1 activities (Benada et al., 2015; Peterson et al., 2011). Studies from the Durocher lab suggest that the importance of this DNA repair inhibition is to prevent telomeres from being inadvertently processed as DSB, with dire consequences for genome integrity (Orthwein et al., 2014).

However, one major challenge for mitotic cells with DSBs is to properly transmit the acentric chromatid fragment with its centric counterpart to the appropriate daughter cell. Since the acentric fragment is lacking a kinetochore, an alternative pathway to the canonical kinetochore-microtubule attachment must operate to segregate the acentric fragment to the appropriate pole. We have discovered that *Drosophila* neural stem cells have evolved a mechanism that tethers the two chromosome fragments and thus ensure their faithful transmission to daughter cells. This mechanism involves the mitotic proteins Polo, BubR1 and Bub3 (Derive et al., 2015; Royou et al., 2010).

Polo is a serine/threonine kinase that plays multiple conserved functions during mitosis including centrosome maturation, bipolar spindle formation, kinetochore function and cytokinesis (Archambault et al., 2015; Llamazares et al., 1991; Sunkel and Glover, 1988). BubR1 and Bub3 act together to stabilize kinetochore-microtubule attachment. They also participate in the spindle assembly checkpoint (SAC), which inhibits the anaphase promoting complex/cyclosome (APC/C), an E3 ubiquitin ligase that triggers anaphase by targeting key substrates for proteolysis, until all chromosomes are properly attached to the spindle (Basu et al., 1999; Basu et al., 1998; Lopes et al., 2005). In a recent study, we provided evidence that BubR1 and Bub3 depend on each other to localize on DSB where they promote the local inhibition of the APC/C via the sequestration of its cofactor Cdc20 (Fzy in *Drosophila*) (Derive et al., 2015). However, the molecular pathways underlying Polo, BubR1 and Bub3 localization on broken chromosomes remain uncharacterized. Here, using a pulsed UV laser to induce DNA breaks in a precise spatiotemporal manner, we investigated the dynamics of recruitment of these mitotic proteins to DNA breaks and the dependency relationships of their localization to the DNA lesion.

## Results

### **Polo, BubR1, Bub3 and Fzy are recruited to laser-induced DSB at all stages of mitosis**

To determine the kinetics of recruitment of Polo, BubR1, Bub3 and Fzy on DSB in mitosis, we induced surgical damage to one chromosome at a given time during mitosis using a 355nm nanosecond pulsed laser, then we immediately monitored the dynamics of fluorescent-tagged proteins on the resulting DNA lesions in live *Drosophila* larvae neuroblasts. Following laser ablation, Polo signals were consistently detected at the site of DNA damage regardless of the stage of mitosis at which the damage was induced, including anaphase (Figure 1A-B). This response was specific to chromosome damage in mitosis, since laser irradiation in interphase nuclei or in the mitotic cytoplasm did not induce Polo foci formation (data not shown). We further showed that BubR1, Bub3 and Fzy were efficiently recruited to DNA breaks when the damage occurred before anaphase. However, these proteins failed to localize on DSB in more than half of the cells when the damage was induced within one minute after the initiation of sister chromatid separation (Figure 1B).

### **Polo is recruited to DSB promptly after laser ablation, preceding BubR1, Bub3 and Fzy recruitment**

Next, we examined the time of appearance of these GFP-tagged proteins on DNA breaks after laser ablation. We found that while BubR1, Bub3 and Fzy appeared on average within 3 minutes following laser ablation, Polo accumulated consistently on DNA breaks 20 to 40 seconds after laser ablation (Figure 2A and C). Laser-induced chromosome ablation in cells co-expressing GFP::BubR1 and mCherry::Polo confirmed the prediction that Polo precede BubR1 on DSB (Figure 2B and C).

Remarkably, these four proteins were accumulated on broken chromosomes during anaphase, post-dissociation from the kinetochore. These results suggest that the mechanism regulating their localization on DSB differs from that controlling their kinetochore localization. This prompted us to measure the time elapsed between anaphase onset and the dissociation of these proteins from chromatin. Interestingly, BubR1, Bub3 and Fzy signals disappeared from broken chromatids at telophase,

concomitantly with chromatin decondensation. In contrast, Polo remained associated with the broken fragment well into the next interphase when chromatin had fully decondensed and the nuclear envelope had reformed (Figure 2A, B and E, data not shown).

### **Polo is required for the robust recruitment of BubR1 and Bub3 to DSB during mitosis**

The observation that Polo precedes BubR1 and Bub3 on DNA breaks prompted us to assess the requirement of Polo activity for the localization of BubR1 and Bub3 to the sites of DNA damage. To do so, we monitored BubR1 and Bub3 dynamics in cells carrying a strong hypomorphic allele of *polo* (*polo*<sup>10</sup>). Attenuation of Polo function severely altered the kinetics of BubR1 and Bub3 recruitment to laser-induced breaks (Figure 3A and B). The appearance of both BubR1 and Bub3 on DNA breaks was greatly delayed (Figure 3B). These data suggest that Polo is required for the efficient accumulation of BubR1 and Bub3 on DNA breaks.

### **Polo, BubR1 and Bub3 are recruited to DSB independently of microtubule polymerization**

One function of Polo during mitosis is to promote the formation of a functional bipolar spindle (Sunkel and Glover, 1988). It is therefore conceivable that the delay in BubR1/Bub3 recruitment to DNA breaks in *polo*<sup>10</sup> mutants is not directly due to the lack of Polo activity around DNA lesions, but rather occurs indirectly as a consequence of perturbed microtubule dynamics (Archambault et al., 2015; Llamazares et al., 1991; Sunkel and Glover, 1988). We therefore evaluated the role of microtubules on BubR1/Bub3 recruitment to DSB. To do so, we induced chromosome damage in dividing neuroblasts previously treated with the microtubule polymerization inhibitor colchicine and monitored the dynamics of the GFP-tagged proteins. Thirty minutes treatment with 10 $\mu$ M colchicine was sufficient to depolymerize microtubules in drosophila larval neuroblasts (data not shown). As expected, inhibition of microtubule polymerization arrested cells in prometaphase with prominent BubR1 and Bub3 kinetochore signals (Figure 4A). In addition, we observed that colchicine treatment did not hinder the kinetics of BubR1 and Bub3 recruitment to laser-induced DSB (Figure

4A and B). Similarly, Polo accumulation on DSB was not affected by the lack of microtubules (Figure 4A and B). These results indicate that microtubules are not required for the efficient accumulation of these proteins on DNA breaks, largely ruling out the possibility that Polo promotes BubR1/Bub3 recruitment to DSB indirectly via its function on spindle dynamics.

### **The putative polo-dependent phosphorylation residues on the BubR1 KARD sequence are not required for the recruitment of BubR1 to laser-induced DSBs**

The molecular mechanism by which Polo recruits BubR1/Bub3 to DNA breaks remains to be elucidated. Since human BubR1 is a direct substrate of PLK1 and PLK1-mediated phosphorylation facilitates BubR1 localization to kinetochores (Elowe et al., 2007), one could imagine that Polo promotes BubR1 and Bub3 recruitment to DNA lesions through direct phosphorylation. We have previously reported that the Bub3-BD domain of BubR1 is necessary and sufficient for the localization of BubR1 to I-Cre1-induced DSB (Derive et al., 2015) (Figure S1A). Here, we confirmed that the Bub3-BD localizes properly on laser-induced DSB with a slight delay compared to full-length BubR1 (Figure S1B). This domain contains the conserved KARD (Kinetochores Attachment Regulatory Domain) sequence (Figure S1A), whose phosphorylation by PLK1 promotes BubR1 association with the phosphatase PP2a/B56 at kinetochores in mammals (Kruse et al., 2013; Suijkerbuijk et al., 2012). We have previously demonstrated that mutation of three putative Polo-dependent phosphorylation residues to alanine or aspartate in the putative *Drosophila* BubR1 KARD sequence (BubR1-KARD-A and BubR1-KARD-D respectively) did not affect BubR1 localization on I-Cre1-induced DSB (Derive et al., 2015). It is possible that the recruitment of BubR1-KARD-A or -D to DSB is not blocked, but that the kinetics are affected in a similar manner to BubR1 kinetics in the *polo*<sup>10</sup> mutant. Thus, we examined the kinetics of BubR1-KARD-A and -D after laser microsurgery (Figure S1B). The timing of appearance of BubR1-KARD-A and -D on broken chromatids was similar to the Bub3-BD suggesting that these three residues do not play a significant role in BubR1 recruitment to DNA lesions.

## **The DNA damage response component Mre11 but not Okra accumulates on DSB during mitosis**

In a previous study, we reported that none of the core kinetochore proteins, including CenpA (Cid in *Drosophila*), CenpC, Spc105, Spc25, Nuf2 nor members of the SAC, Mps1, Mad1 or Mad2, localized on I-Crel and laser-induced DNA breaks (Royou et al., 2010; Derive et al., 2015, data not shown). These data indicate that the formation of a neo-kinetochore on broken chromosomes is highly unlikely. Since Cid is required for the localization of Polo and BubR1 on kinetochores (Blower and Karpen, 2001), we reasoned that Polo and BubR1/Bub3 localization on DNA breaks is mediated via interactions with components that do not depend on kinetochore proteins. Recent studies in vertebrates showed that components of the early steps of the DDR, including the MRN (Mre11-Rad50-Nbs1) complex, ATM and  $\gamma$ H2Ax, form foci on damaged chromosomes during mitosis (Giunta et al., 2010; Gomez-Godinez et al., 2010; Orthwein et al., 2014). It may be that a similar primary DDR is activated in *drosophila* mitotic cells and promote the recruitment of Polo and, consequently, BubR1 and Bub3 to DNA lesions.

Thus, we first sought to determine if the activation of the initial steps of the DDR in mitosis was conserved in *Drosophila*. To do so, we examined the dynamics of two components of the MRN complex Mre11 and Rad50, after laser-induced DNA breaks. We first controlled that GFP-tagged Mre11 and mRFP-tagged Rad50 were able to accumulate on laser-induced DNA damage in interphase nuclei (data not shown). Moreover, one dose of mRFP-Rad50 rescued the lethality associated with *rad50<sup>EP</sup>* strong hypomorph mutation demonstrating that mRFP did not affect Rad50 function. We observed that after laser ablation in mitotic neuroblasts, both mRFP-Rad50 and GFP::Mre11 accumulated promptly at the site of damage (Figure 5A). GFP-Mre11 signal appeared within 10 seconds on average following laser ablation, which was even faster than Polo (Figure 5B). Remarkably, attenuation of Polo, BubR1 or Bub3 activity did not affect the kinetics of recruitment of Mre11 to DSB in mitosis suggesting that the MRN complex acts upstream of these mitotic proteins (Figure 5C). Equally important,  $\gamma$ H2Az is readily detected at the site of damage in mitosis, consistent with ATM activation upon DNA damage in *Drosophila* mitotic cells (Royou et al., 2010).

In vertebrates, the pathway downstream of MRN and ATM involved in DNA repair is inhibited during mitosis (Giunta et al., 2010; Orthwein et al., 2014; Peterson et al., 2011; Terasawa et al., 2014). To determine if this inhibition is conserved in *Drosophila*, we monitored the dynamics of Okra (*Drosophila* homolog of Rad54), a helicase involved in DNA repair by homologous recombination (HR) (Kooistra et al., 1999; Schupbach and Wieschaus, 1991), in live cells after laser ablation. As expected, a prominent Okra::GFP focus was detected at the site of laser-induced damage in interphase nuclei indicating that DNA repair by HR was initiated (Figure S2, cell#2). In contrast, no Okra::GFP signal was observed on damaged chromosomes in mitotic cells (Figure S2, Cell#1). Collectively, these results provide evidence that, similar to vertebrates, the early steps of the DDR is activated upon DNA damage in *Drosophila* mitotic cells. This is followed by an inhibition of the downstream repair pathway by HR.

### **Rad50 and ATM but not H2Az are required for the efficient association of Polo, BubR1 and Bub3 to the site of DNA damage**

We hypothesized that the recognition of DSB by the MRN complex during mitosis promotes the activation of ATM, which phosphorylates H2Az on chromatin proximal to the breaks. This primary DNA damage signaling may facilitate the recruitment of Polo and, subsequently, BubR1 and Bub3 to DNA breaks. To test this idea, we monitored the dynamics of Polo, BubR1 and Bub3 in *rad50*, *atm* (also called *tefu* for telomere fusion in *Drosophila*) and *h2az* mutants. These genes are essential in *Drosophila*, and null or strong hypomorphic alleles of each of these genes result in lethality at the pupal stage (Bi et al., 2004; Ciapponi et al., 2004; Gorski et al., 2004; Silva et al., 2004; Song et al., 2004; van Daal and Elgin, 1992). Furthermore, it has been demonstrated that *Drosophila* ATM and Rad50 have conserved functions in DNA repair signaling and telomere protection (Bi et al., 2004; Ciapponi et al., 2004; Gorski et al., 2004; Silva et al., 2004; Song et al., 2004).

We first controlled that Mre11 was no longer detected on DSB in interphase and mitosis in *rad50<sup>EP</sup>* mutant cells (Figure 6A and data not shown). We then monitored the kinetics of recruitment of Polo in *rad50<sup>EP</sup>* and *atm* mutant cells (see methods for *atm* allelic combinations). We observed a moderate decrease in the frequency of cells with a detectable Polo signal on DSB in *rad50<sup>EP</sup>* (Figure 6B). In



contrast, attenuation of ATM function did not affect the frequency of cells with a detectable Polo signal at DSB. However, in both *atm* and *rad50<sup>EP</sup>* mutants, the time of appearance of Polo signal on DSB was severely delayed (Figure 6C). Consistent with Polo being required for BubR1 and Bub3 recruitment to DSB, we found that the localization of BubR1 and Bub3 to DSBs in *rad50<sup>EP</sup>* and *atm* mutants was similarly impaired. A large proportion of *rad50<sup>EP</sup>* and *atm* mutant cells did not exhibit a detectable BubR1 or Bub3 signal on DSB (Figure 6B). When BubR1 or Bub3 signal was observed, it was dramatically delayed in these mutants compared with wild type cells (Figure 6D). We conclude that the MRN complex and ATM are required for the robust recruitment of Polo, BubR1 and Bub3 to DSBs during mitosis.

To evaluate the importance ATM-dependent H2Az phosphorylation for the recruitment of Polo, BubR1 and Bub3 to damaged chromatin, we monitored the dynamics of these proteins in *h2az* null mutants (*h2az<sup>810</sup>*). We found that the kinetics of Polo, BubR1 and Bub3 at the site of damage was not affected in *h2az<sup>810</sup>* mutant cells (Figure 6B-D). This observation indicates that Polo, BubR1 and Bub3 are efficiently recruited to DSB independently of H2Az phosphorylation on chromatin near the lesions and suggests an alternative mechanism by which ATM promotes Polo, BubR1 and Bub3 recruitment to DSB. Previous studies in H2Ax<sup>-/-</sup> mouse embryo fibroblasts demonstrated that the lack of H2Ax did not abrogate the initial detection of DSB by the MRN complex in interphase (Celeste et al., 2003). Thus, it is likely that the MRN complex is efficiently recruited to DSB in mitosis in *Drosophila h2Az* mutant cells, where it promotes the rapid localization of Polo, BubR1 and Bub3, possibly via ATM activation at the lesions.

### **Stable localization of Mre11 to chromatin promotes the recruitment of Rad50 and Polo independently of DNA damage**

Previous studies showed that prolonged binding of the MRN complex to chromatin was sufficient to trigger the recruitment and activation of downstream components of the DDR independently of DNA damage (Bonilla et al., 2008; Soutoglou and Misteli, 2008). To determine if ectopic localization of the MRN complex to chromatin was sufficient to recruit Polo independently of DNA lesions in mitosis, we fused Mre11 to the *E. coli* lactose repressor (LacI) tagged with GFP and introduced it into flies

carrying an X chromosome with 256 repeats of the lac operator sequence (LacO) located near the telomere (Figure 7A) (Belmont and Straight, 1998). We first controlled that the fusion protein was efficiently recruited to laser-induced DNA damage in mitosis and co-localized with mRFP::Rad50 at the site of damage (Figure S3). Next, we monitored the localization of the fusion proteins in flies carrying one X chromosome with 256 lacO repeats. As expected, GFP::LacI::Mre11 accumulated on the lacO array to form distinct foci on one X homolog during mitosis (Figure 7B). In addition, mRFP::Rad50 co-localized with GFP::LacI::Mre11, indicating that this ectopic localization of Mre11 on chromatin was effectively recruiting Rad50 (Figure 7B). Interestingly, a weak mCherry::Polo signal was also detected with GFP::LacI::Mre11 foci (Figure 7B). This result indicates that the ectopic localization of the MRN complex is sufficient to trigger the accumulation of Polo on chromatin independently of DNA damage.

## Discussion

Collectively, these results, combined with our previous studies, are consistent with a model in which DSB are processed in mitotic *Drosophila* cells via an MRN/ATM and a Polo/BubR1/Bub3-dependent pathway. The presence of DSB in mitosis triggers a cascade of events, initiated by the recognition of the DSB by the MRN complex, which is likely to promote ATM activation near the lesions. This facilitates the prompt and robust recruitment of Polo to DSB. Polo, in turn, promotes the accumulation of the BubR1/Bub3 complex at the site of lesions. One function of this complex is to induce the local inhibition of APC/C near the site of damage via the sequestration of Fzy (Figure 7C) (Derive et al., 2015; Royou et al., 2010). This inhibition may preserve key APC/C substrates from proteolysis, which is essential for the tethering of the broken chromatids and their proper segregation to the pole. This mechanism ensures that the nascent daughter cell inherits the two broken chromatids, an essential first step prior to their efficient repair in the ensuing interphase.

The delay in the appearance of Polo, BubR1 and Bub3 on DSB observed in *rad50* or *atm* mutants led us to posit that the MRN and ATM play a positive role in promoting the recruitment of these proteins to DSB in mitosis. Support for this conclusion comes from studies of BubR1 dynamics in cells with dysfunctional telomeres. They revealed that BubR1 localizes on unprotected telomeres in a Rad50 and ATM-dependent manner in *Drosophila* mitotic neuroblasts (Musaro et al., 2008). It is thought that BubR1 functions at uncapped telomeres to activate the SAC and induce a subsequent delay in the metaphase to anaphase transition (Musaro et al., 2008). However, we found that the delay in metaphase triggered by the presence of I-Cre1-induced damage was not dependent on BubR1 but required the DNA damage checkpoint component Chk1 (Grapes in *Drosophila*)(Royou et al., 2005). In addition, we found that while attenuation of BubR1 checkpoint activity did not affect the DNA damage-mediated delay in mitosis, it severely impaired the segregation of broken chromosomes (Derive et al., 2015; Royou et al., 2010). BubR1 remains strongly associated with the DNA lesions during anaphase and efficiently inhibits APC/C activity near the damage, at a time APC/C is globally active (Derive et al., 2015; Royou et al., 2010)(Figure 1 and 2 of this study). It is conceivable that BubR1

interactions on DSB are more stable than BubR1 association with free telomeres, which results in the spatial restriction of BubR1-mediated APC/C inhibition near the DNA lesions.

We previously reported that attenuation of ATM function did not prevent BubR1 localization on I-Crel-induced DNA lesions (Derive et al., 2015). Similarly, in this study we show that BubR1 localization on laser-induced DSB was not abrogated in the majority of *atm* mutant cells. However, the kinetics of BubR1 on DSB was severely altered. These observations suggest that ATM plays an important role in the timely and effective loading of BubR1 on damaged chromatin, but that it is less important for the maintenance of BubR1 on the lesions. Alternatively, due to their inherent differences (spatial, morphological and time at which they are created), laser and I-Crel-induced DSB may trigger distinct ATM-dependent and independent signaling pathways to promote BubR1 recruitment to damaged chromatin. Careful quantification of BubR1 signal on I-Crel-induced lesions in wild type and *atm* mutant cells would be useful to re-assess the requirement for ATM-dependent targeting of BubR1 to I-Crel-induced breaks.

In mammals, ATM prevents Polo activation in G2 phase through inhibition of its phosphorylation (Bruinsma et al., 2017; van Vugt et al., 2001; Wang et al., 2015). It is, therefore, surprising that in *Drosophila* mitotic cells, Polo requires ATM for its robust accumulation on DSB. It has been shown that ATM is readily active upon DNA damage during mitosis albeit with a reduced kinetics (Giunta et al., 2010). One can speculate that different levels of ATM activity are required for inhibition or activation of Polo. Alternatively, ATM substrates may be different upon DNA damage in interphase vs mitosis with opposite outcomes on Polo activity. Interestingly proteomic analysis of ATM substrates upon DNA damage identified mitotic proteins including Bub1, Mad2 and subunits of cohesin and condensin complexes (Matsuoka et al., 2007).

Future studies will decipher the molecular pathway(s) by which the MRN complex and ATM promote Polo recognition of DSB and how Polo, in turn, facilitates the recruitment of BubR1/Bub3 to broken chromosomes. Current anti-cancer therapies rely heavily on the induction of extensive DNA damage either by irradiation or genotoxic agents. Thus, deciphering the molecular pathways that process DNA damage in healthy mitotic cells may improve our understanding of tumor resistance to

these therapies and may help identify novel targets that will enhance the efficacy of these therapies.

## Methods

### Fly strains

Flies were grown on corn flour and yeast extract medium in standard conditions at 25°C. The *h2az>H2A.Z::mRFP* stock was obtained from the Bloomington Drosophila Stock Center (Indiana University, USA). *Bub3>EGFP::Bub3* stock was provided by C. Lehner (Institute of Molecular Sciences, University of Zurich, Switzerland). The *bubR1>GFP::BubR1* was provided by R. Karess (Institute Jacques Monod, Paris, France). The stock *GFP::Polo* was provided by C. Sunkel (Instituto de Biologia Molecular e Cellular, Porto, Portugal). The stock *ubi>GFP::Fzy* was provided by J. Raff (Sir William Dunn School of Pathology, University of Oxford, UK). The *bubR1<sup>1</sup>* (Basu et al., 1999), *bub3<sup>1</sup>* (Lopes et al., 2005), *polo<sup>10</sup>* (Donaldson et al., 2001), *h2av<sup>810</sup>* (van Daal and Elgin, 1992), *rad50<sup>EP</sup>* (Ciapponi et al., 2004; Gorski et al., 2004) and *atm<sup>3</sup>* and *atm<sup>6</sup>* (Silva et al., 2004) mutations were previously described. The stocks *ubi>GFP::BubR1 FL*, *ubi>GFP::Bub3-BD*, *ubi>GFP::BubR1-KARD-A* and *ubi>GFP::BubR1-KARD-D* used in figure S1 were described in our previous study (Derive et al., 2015). The transgenic stocks *ubi>GFP::Mre11*, *ubi>mRFP::Rad50*, *ubi>GFP::LacI::Mre11* and *ubi>Okra::GFP* were produced in our laboratory for this study. In figure 6, the *atm<sup>3</sup>/atm<sup>6</sup>* allelic combination was used to monitor and *GFP::Polo*, *GFP::BubR1* and *GFP::Bub3* dynamics on DSB.

### Molecular cloning

All plasmids were verified by sequencing before being injected into fly embryos to generate transgenic stocks (Bestgene Inc.).

***ubi>GFP::Mre11* cloning:** The *Mre11* sequence was amplified from pBluescript KS-*Mre11* vector obtained from DGRC (n°LD08638) using *Mre11Nt-F* (5'GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTGATGAATGGCACCACGACAGCAG AGCAG3') and *Mre11Nt-R* (GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTCAATC GGAATCATCCGATATAACATAGCTGGC) primers, which contain the *AttB1* and *AttB2* Gateway sequence respectively. The PCR product was inserted into the pDONR/*Zeo* vector (Life technologies) to create entry clone. Entry vector containing the *Mre11* sequence was recombined into the pUbi-*GFP::GAT* vector containing the ubiquitin

promoter and a N-terminal GFP tag (a gift from J. Raff).

**ubi>Okra::GFP cloning:** The Okra coding sequence was amplified from pOT2-Okra vector obtained from DGRC (n°LD35220) using oligonucleotides OkrCt-F 5'-GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCAGAAAAAATGCGGCGCAGTCTGGCTCCC-3', which contains the AttB1 Gateway sequence and the Kozak sequence, and OkrCt-R 5'-GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTGAATCCACGGAA-GTCCTCATCGC-3', which contain AttB2 Gateway sequence and no STOP codon. The PCR product was inserted into the pDONR/Zeo vector (Life technologies). Entry vector containing the Okra sequence was recombined into the pUbi-GAT::GFP vector containing the ubiquitin promoter and a C-terminal GFP tag (a gift from J. Raff).

**ubi>GFP::LacI::Mre11 cloning:** The LacI sequence was amplified from pGEX6p2 vector using LacINt-F (5'GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTGGTGAAACCAGTAACGTTATACGATGTC3'), which contains the AttB1 Gateway sequence and Lnk-LacINt-R (5'AGCCCCTGCGCCGGCTCCCGCACCCCTGCCCGCTTCCAGTCGGGAAA3'), which adds a GAGAGAGA linker to the C terminus of LacI. The Mre11 coding sequence containing the GAGAGAGA linker on its N terminus was amplified from pENTR-N-Mre11 vector with Lnk-Mre11-F (5'GGTGCGGGAGCCGGCGCAGGGGCTATGAATGGCACCCACGACAGCAGAGCAG3') and Mre11Nt-R primers. The complete sequence was amplified from the PCR products with LacINt-F and Mre11Nt-R primers. The final PCR product was used to create an entry clone which was recombined with pUbi-GFP::GAT destination vector to obtain the plasmid ubi>GFP::LacI::Mre11.

**ubi>mRFP::Rad50 cloning:** The Rad50 sequence was amplified from pOT2-Rad50 vector (n°LP09268, Drosophila Genomics Resource Center, Indiana, USA) using Rad50Nt-F (5'GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTGATGTCGTCAATTGAATCGCTGTCC) and Rad50Nt-R (5'GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTATTGATCTATCAAAGCTTTCTTTGATGGACCC3') primers, which contain the AttB1 and AttB2 Gateway sequences respectively. This PCR product was then used to create an entry clone subsequently recombined with the destination vector pURW (DGRC) to obtain the final plasmid ub>mRFP::Rad50.

**polo>mCherry::Polo cloning:** The polo>mCherry::Polo construct was obtained by multistep cloning. First, a region of 881 nucleotides upstream of the polo initiation codon was amplified from genomic DNA using the BamHI-Polo-Prom-Fwd (5'ATCGGATCCCACCAATAGTGGGGT3') and EcoRI-Polo-Prom-Rev (5'GATGAATTCCTTGCTCTCCTTTCT3') primers, introducing BamHI and EcoRI restriction sites, respectively. mCherry was amplified from pQE60-mCherry using EcoRI-mCherry-Fwd (5'ACTGAATTCATGGTGAGCAAGGGC3') and NotI-linker-mCherry-Rev (5'AGTGCGGCCGCCAGCGCCTGCTCCTGCGCCAGCACCGTGATGGTGATGGTG3') primers, introducing EcoRI and NotI sites and a GAGAGAGA linker after the mCherry sequence. The cDNA Polo sequence was amplified with NotI-Polo-CDS5'-Fwd (5'ATCGCGGCCGCATGGCCGCGAAGCCC3') and KpnI-Polo-CDS3'-Rev (5'GATGTACCCCAGTGTGTGAAATGCAA3') primers, introducing NotI and KpnI sites. A region of 704 nt after the end of PoloCDS was amplified from genomic DNA using Xho1-Polo-UTR3'-Fwd (CGACTCGAGGCGTAGCCAGCCCAACTAT) and Polo-UTR3'-Kpn1-Rev (GATGGTACCAATAATTCTCAGCCGCCTG) primers, introducing XhoI and KpnI sites. Each PCR product was first inserted in pGEM-T easy vector. After digestion, the products were ligated into pAttB vector. Ligation of this product resulted in the final pAttB polo>mCherry::Polo vector.

### **Live analysis of larval Neuroblasts**

For live imaging, late third-instar larvae were dissected in PBS (phosphate buffer saline 1X) and their brain transferred in a drop of PBS on a coverslip. The brain was slightly squashed by capillarity and the coverslip was sealed with Halocarbon oil 700 (sigma) as described in (Buffin et al., 2005). For the colchicine experiment, the larval brain was incubated in PBS + 10 $\mu$ M Colchicine for 30 minutes before preparation for live imaging. Live analysis was performed at room temperature with a 100x oil Plan-Apochromat objective lens (NA 1.4) and an Axio-Observer.Z1 microscope (Carl Zeiss) equipped with a spinning disk confocal (Yokogawa), an EMCCD Evolve camera (Photometrics and Roper Scientific) and 4910nm (100mW; Cobolt calypso) and 561nm (100mW; Cobolt Jive) lasers. Images were acquired with Metamorph software (Roper Scientific). Z series of 0,5 $\mu$ m steps were acquired every 5s or 20s. All images are maximum-intensity projections. A 355nm pulsed laser (passively Q-switched SNV-



20F-000) with a 21kHz repetition rate, 0.8  $\mu$ J energy/pulse, 2kW of peak power and 400 ps pulse width, powered with an iLas PULSE system (Roper Scientific) was used at 20% power for one pulse (100ms) to induced breaks on one chromosome.

ImageJ (Fiji, National Institut of Health) was used for image processing and quantification. Graphs and statistics were done with Prism (GraphPad).

## **Acknowledgments**

We thank Derek McCusker (European Institute of Chemistry and Biology, Pessac, France) and all team members for technical help, fruitful discussion and critical reading of the manuscript. C.L., Y.P., E.M. and A.R. were supported by Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS). C.L. and A.R. were also supported by the Conseil Régional d'Aquitaine (20111301010) and CNRS. P.P.E and A.R. were supported by ERC-STG-2012 (GA311358-NoAneuploidy).

## References

- Archambault, V., G. Lepine, and D. Kachaner. 2015. Understanding the Polo Kinase machine. *Oncogene*.
- Basu, J., H. Bousbaa, E. Logarinho, Z. Li, B.C. Williams, C. Lopes, C.E. Sunkel, and M.L. Goldberg. 1999. Mutations in the essential spindle checkpoint gene *bub1* cause chromosome missegregation and fail to block apoptosis in *Drosophila*. *J Cell Biol.* 146:13-28.
- Basu, J., E. Logarinho, S. Herrmann, H. Bousbaa, Z. Li, G.K. Chan, T.J. Yen, C.E. Sunkel, and M.L. Goldberg. 1998. Localization of the *Drosophila* checkpoint control protein *Bub3* to the kinetochore requires *Bub1* but not *Zw10* or *Rod*. *Chromosoma.* 107:376-385.
- Belmont, A.S., and A.F. Straight. 1998. In vivo visualization of chromosomes using lac operator-repressor binding. *Trends in cell biology.* 8:121-124.
- Benada, J., K. Burdova, T. Lidak, P. von Morgen, and L. Macurek. 2015. Polo-like kinase 1 inhibits DNA damage response during mitosis. *Cell Cycle.* 14:219-231.
- Bi, X., S.C. Wei, and Y.S. Rong. 2004. Telomere protection without a telomerase; the role of ATM and Mre11 in *Drosophila* telomere maintenance. *Curr Biol.* 14:1348-1353.
- Blower, M.D., and G.H. Karpen. 2001. The role of *Drosophila* CID in kinetochore formation, cell-cycle progression and heterochromatin interactions. *Nature cell biology.* 3:730-739.
- Bonilla, C.Y., J.A. Melo, and D.P. Toczyski. 2008. Colocalization of sensors is sufficient to activate the DNA damage checkpoint in the absence of damage. *Molecular cell.* 30:267-276.
- Bruinsma, W., M. Aprelia, I. Garcia-Santisteban, J. Kool, Y.J. Xu, and R.H. Medema. 2017. Inhibition of Polo-like kinase 1 during the DNA damage response is mediated through loss of Aurora A recruitment by Bora. *Oncogene.* 36:1840-1848.
- Buffin, E., C. Lefebvre, J. Huang, M.E. Gagou, and R.E. Karess. 2005. Recruitment of Mad2 to the kinetochore requires the Rod/Zw10 complex. *Curr Biol.* 15:856-861.
- Celeste, A., O. Fernandez-Capetillo, M.J. Kruhlak, D.R. Pilch, D.W. Staudt, A. Lee, R.F. Bonner, W.M. Bonner, and A. Nussenzweig. 2003. Histone H2AX phosphorylation is dispensable for the initial recognition of DNA breaks. *Nature cell biology.* 5:675-679.
- Ciapponi, L., G. Cenci, J. Ducau, C. Flores, D. Johnson-Schlitz, M.M. Gorski, W.R. Engels, and M. Gatti. 2004. The *Drosophila* Mre11/Rad50 complex is required to prevent both telomeric fusion and chromosome breakage. *Curr Biol.* 14:1360-1366.
- Derive, N., C. Landmann, E. Montembault, M.C. Claverie, P. Pierre-Elies, D. Goutte-Gattat, N. Founounou, D. McCusker, and A. Royou. 2015. Bub3-BubR1-dependent sequestration of Cdc20Fizzy at DNA breaks facilitates the correct segregation of broken chromosomes. *J Cell Biol.* 211:517-532.
- Donaldson, M.M., A.A. Tavares, H. Ohkura, P. Deak, and D.M. Glover. 2001. Metaphase arrest with centromere separation in polo mutants of *Drosophila*. *J Cell Biol.* 153:663-676.
- Elowe, S., S. Hummer, A. Uldschmid, X. Li, and E.A. Nigg. 2007. Tension-sensitive Plk1 phosphorylation on BubR1 regulates the stability of kinetochore microtubule interactions. *Genes & development.* 21:2205-2219.
- Falck, J., J. Coates, and S.P. Jackson. 2005. Conserved modes of recruitment of ATM, ATR and DNA-PKcs to sites of DNA damage. *Nature.* 434:605-611.

Giunta, S., R. Belotserkovskaya, and S.P. Jackson. 2010. DNA damage signaling in response to double-strand breaks during mitosis. *J Cell Biol.* 190:197-207.

Gomez-Godinez, V., T. Wu, A.J. Sherman, C.S. Lee, L.H. Liaw, Y. Zhongsheng, K. Yokomori, and M.W. Berns. 2010. Analysis of DNA double-strand break response and chromatin structure in mitosis using laser microirradiation. *Nucleic acids research.* 38:e202.

Gorski, M.M., R.J. Romeijn, J.C. Eeken, A.W. de Jong, B.L. van Veen, K. Szuhai, L.H. Mullenders, W. Ferro, and A. Pastink. 2004. Disruption of *Drosophila* Rad50 causes pupal lethality, the accumulation of DNA double-strand breaks and the induction of apoptosis in third instar larvae. *DNA Repair (Amst).* 3:603-615.

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

Jackson, S.P., and J. Bartek. 2009. The DNA-damage response in human biology and disease. *Nature.* 461:1071-1078.

Kooistra, R., A. Pastink, J.B. Zonneveld, P.H. Lohman, and J.C. Eeken. 1999. The *Drosophila melanogaster* DmRAD54 gene plays a crucial role in double-strand break repair after P-element excision and acts synergistically with Ku70 in the repair of X-ray damage. *Molecular and cellular biology.* 19:6269-6275.

Kruse, T., G. Zhang, M.S. Larsen, T. Lischetti, W. Streicher, T. Kragh Nielsen, S.P. Bjorn, and J. Nilsson. 2013. Direct binding between BubR1 and B56-PP2A phosphatase complexes regulate mitotic progression. *J Cell Sci.* 126:1086-1092.

Llamazares, S., A. Moreira, A. Tavares, C. Girdham, B.A. Spruce, C. Gonzalez, R.E. Karess, D.M. Glover, and C.E. Sunkel. 1991. polo encodes a protein kinase homolog required for mitosis in *Drosophila*. *Genes & development.* 5:2153-2165.

Lopes, C.S., P. Sampaio, B. Williams, M. Goldberg, and C.E. Sunkel. 2005. The *Drosophila* Bub3 protein is required for the mitotic checkpoint and for normal accumulation of cyclins during G2 and early stages of mitosis. *J Cell Sci.* 118:187-198.

Matsuoka, S., B.A. Ballif, A. Smogorzewska, E.R. McDonald, 3rd, K.E. Hurov, J. Luo, C.E. Bakalarski, Z. Zhao, N. Solimini, Y. Lerenthal, Y. Shiloh, S.P. Gygi, and S.J. Elledge. 2007. ATM and ATR substrate analysis reveals extensive protein networks responsive to DNA damage. *Science.* 316:1160-1166.

Melo, J., and D. Toczyski. 2002. A unified view of the DNA-damage checkpoint. *Current opinion in cell biology.* 14:237-245.

Musaro, M., L. Ciapponi, B. Fasulo, M. Gatti, and G. Cenci. 2008. Unprotected *Drosophila melanogaster* telomeres activate the spindle assembly checkpoint. *Nature genetics.* 40:362-366.

Orthwein, A., A. Fradet-Turcotte, S.M. Noordermeer, M.D. Canny, C.M. Brun, J. Strecker, C. Escribano-Diaz, and D. Durocher. 2014. Mitosis inhibits DNA double-strand break repair to guard against telomere fusions. *Science.* 344:189-193.

Peterson, S.E., Y. Li, B.T. Chait, M.E. Gottesman, R. Baer, and J. Gautier. 2011. Cdk1 uncouples CtIP-dependent resection and Rad51 filament formation during M-phase double-strand break repair. *J Cell Biol.* 194:705-720.

Rogakou, E.P., D.R. Pilch, A.H. Orr, V.S. Ivanova, and W.M. Bonner. 1998. DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. *The Journal of biological chemistry.* 273:5858-5868.

Royou, A., M.E. Gagou, R. Karess, and W. Sullivan. 2010. BubR1- and Polo-Coated DNA Tethers Facilitate Poleward Segregation of Acentric Chromatids. *Cell.* 140:235-245.

Royou, A., H. Macias, and W. Sullivan. 2005. The Drosophila Grp/Chk1 DNA damage checkpoint controls entry into anaphase. *Curr Biol.* 15:334-339.

Schupbach, T., and E. Wieschaus. 1991. Female sterile mutations on the second chromosome of *Drosophila melanogaster*. II. Mutations blocking oogenesis or altering egg morphology. *Genetics.* 129:1119-1136.

Sekelsky, J. 2017. DNA Repair in *Drosophila*: Mutagens, Models, and Missing Genes. *Genetics.* 205:471-490.

Silva, E., S. Tiong, M. Pedersen, E. Homola, A. Royou, B. Fasulo, G. Siriaco, and S.D. Campbell. 2004. ATM is required for telomere maintenance and chromosome stability during *Drosophila* development. *Curr Biol.* 14:1341-1347.

Song, Y.H., G. Mirey, M. Betson, D.A. Haber, and J. Settleman. 2004. The *Drosophila* ATM ortholog, dATM, mediates the response to ionizing radiation and to spontaneous DNA damage during development. *Curr Biol.* 14:1354-1359.

Soutoglou, E., and T. Misteli. 2008. Activation of the cellular DNA damage response in the absence of DNA lesions. *Science.* 320:1507-1510.

Suijkerbuijk, S.J., M. Vleugel, A. Teixeira, and G.J. Kops. 2012. Integration of kinase and phosphatase activities by BUBR1 ensures formation of stable kinetochore-microtubule attachments. *Dev Cell.* 23:745-755.

Sunkel, C.E., and D.M. Glover. 1988. polo, a mitotic mutant of *Drosophila* displaying abnormal spindle poles. *J Cell Sci.* 89 ( Pt 1):25-38.

Terasawa, M., A. Shinohara, and M. Shinohara. 2014. Canonical non-homologous end joining in mitosis induces genome instability and is suppressed by M-phase-specific phosphorylation of XRCC4. *PLoS genetics.* 10:e1004563.

van Daal, A., and S.C. Elgin. 1992. A histone variant, H2AvD, is essential in *Drosophila melanogaster*. *Mol Biol Cell.* 3:593-602.

van Vugt, M.A., V.A. Smits, R. Klompmaker, and R.H. Medema. 2001. Inhibition of Polo-like kinase-1 by DNA damage occurs in an ATM- or ATR-dependent fashion. *The Journal of biological chemistry.* 276:41656-41660.

Wang, L., Q. Guo, L.A. Fisher, D. Liu, and A. Peng. 2015. Regulation of polo-like kinase 1 by DNA damage and PP2A/B55alpha. *Cell Cycle.* 14:157-166.

## Figure legend

**Figure 1. Polo, BubR1, Bub3 and Fizzy are recruited to laser-induced DNA breaks in mitosis.** (A) Time lapse images of *Drosophila* third instar larvae neuroblasts expressing H2Az::mRFP (red) and the indicated GFP-tagged proteins after laser ablation (LA) at the indicated mitotic stage. The yellow arrowheads indicate the site of laser ablation. The cell is monitored within few seconds after laser ablation. The white arrows point to the localization of the proteins on DNA breaks. Scale Bar=5 $\mu$ m. (B) Frequency of cells where a signal of the indicated protein is detected on LA-induced breaks.

**Figure 2. Polo is recruited to DNA breaks in mitosis before BubR1/Bub3/Fizzy and remains on the breaks well into the next interphase.** (A) Time lapse images of *Drosophila* third instar larvae neuroblasts expressing H2Az::mRFP (red) and the indicated GFP-tagged proteins after laser ablation. The yellow arrowheads indicate the site of laser ablation. The cell is monitored within few seconds after laser ablation (time 0:00). The white arrows point to the localization of the proteins on DNA breaks. Time: min:sec. Scale Bar=5 $\mu$ m. (B) Time-lapse images of a neuroblast expressing GFP::BubR1 (top panel and cyan in merge) and mCherry::Polo (middle panel and red in merge) after laser ablation. The yellow arrowheads indicate the site of laser ablation. The cell is monitored within few seconds after laser ablation (time 0:00). The cyan and red arrows point to the localization of GFP::BubR1 and Cherry::Polo respectively on DNA breaks. Time: min:sec. Scale Bar=5 $\mu$ m. The insets present the localization of the indicated protein at the site of damage. (C) Scatter dot-plot showing the appearance of the indicated proteins on laser-induced breaks from laser ablation. (D) Scatter dot-plot showing the appearance of GFP::BubR1 and mCherry::Polo on laser-induced breaks from laser ablation. (E) Scatter dot-plot showing the disappearance of the indicated proteins from the DSB after anaphase onset. The lines correspond to mean $\pm$ CI95%.

**Figure 3. Polo mediates the efficient recruitment of BubR1/Bub3 to DNA breaks.** (A) Representative time-lapse images of *polo* mutant neuroblasts expressing

H2Az::mRFP (red) and GFP::BubR1 or GFP::Bub3 after laser ablation. The yellow arrowheads indicate the site of laser ablation. The cell is monitored within few seconds after laser ablation (time 0:00). The cyan arrows point to the localization of the indicated proteins on DNA breaks. The numbers represent the percentage of cells with a detectable signal on DNA breaks (n=19 and n=9 cells for GFP::Bub3 and GFP::BubR1 respectively). Time=min:sec. Scale Bar=5 $\mu$ m. (B) Scatter dot-plot showing the appearance of GFP::Bub3 and GFP::BubR1 on laser-induced breaks from laser ablation in WT and polo mutant cells. The lines correspond to mean $\pm$ CI95%.

**Figure 4. BubR1, Bub3 and Polo recruitment to DNA breaks does not require microtubule polymerization.** (A) Time lapse images of neuroblasts expressing H2Av::mRFP (red) and the indicated proteins treated for 30 minutes with 10 $\mu$ M colchicine. The yellow arrowheads indicate the site of laser ablation. The cell is monitored within few seconds after laser ablation (time 0:00= min:sec). The white arrows point to the localization of the proteins on DNA breaks. \* indicates the time at which the signal appears on DNA breaks. The numbers represent the percentage of cells with a detectable signal on DSB. Time=min:sec. Scale Bar=5 $\mu$ m. (B) Scatter dot-plot showing the appearance of the indicated proteins on laser-induced breaks in control and after treatment with 10 $\mu$ M colchicine. The lines correspond to mean $\pm$ CI95%.

**Figure 5. Mre11 and Rad50 are recruited to DSB in mitosis.** (A) Time lapse images of neuroblasts expressing H2Az::mRFP and GFP::Mre11 (top panel) or H2Av::GFP and mRFP::Rad50 (bottom panel) after laser ablation. The yellow arrowheads indicate the site of laser ablation. The cell is monitored within few seconds after laser ablation (time 0:00). The cyan arrows point to the localization of GFP::Mre11 and mRFP::Rad50 on DNA breaks. Time: min:sec. Scale Bar=5 $\mu$ m. AO: Anaphase Onset. (B) Scatter dot-plot showing the appearance of GFP::Mre11 and GFP::Polo (as shown in Figure 2B) on laser-induced breaks from laser ablation. (C) Scatter dot-plot showing the appearance of GFP::Mre11 on laser-induced breaks from laser ablation in the indicated mutants. The lines correspond to mean $\pm$ CI95%. A Mann-Whitney test was used to calculate P values. (\*\*\*\* corresponds to P<0.001).

**Figure 6. The robust recruitment of Polo, BubR1 and Bub3 to DNA breaks in mitosis depends on Rad50 and ATM, independently of H2Az phosphorylation.**

(A) Time lapse images of *rad50<sup>EP</sup>* mutant cells expressing H2Az::mRFP and GFP::Mre11 after laser ablation. The yellow arrowheads indicate the site of laser ablation. The cell is monitored within few seconds after laser ablation (time 0:00). No GFP::Mre11 signal was detected on DNA breaks in 100% of *rad50<sup>EP</sup>* mutant cells (n=15). Time: min:sec. Scale Bar=5 $\mu$ m. (B) Frequency of wild type (WT), *rad50<sup>EP</sup>*, *atm* or *h2az<sup>B10</sup>* mutant cells with a detectable signal of the indicated proteins on DNA breaks. (C) Scatter dot-plot showing the appearance of GFP::Polo on laser-induced breaks from laser ablation in the indicated mutants. (D) Scatter dot-plot showing the appearance of GFP::BubR1 and GFP::Bub3 on laser-induced breaks from laser ablation in the indicated mutants. The lines correspond to mean $\pm$ CI95%. A Mann-Whitney test was used to calculate P values. (\*\*\*\* corresponds to P<0.0001, \*\* corresponds to P<0.002, \* corresponds to P<0.03).

**Figure 7. Ectopic localization of Mre11 on chromatin is sufficient to recruit Polo independently of DNA damage.**

(A) Scheme of Drosophila chromosome X containing 256 LacO repeats located at position 1E. These repeats are binding sites for the budding yeast transcriptional repressor LacI. The expression of GFP::LacI fused with Mre11 suffices to target Mre11 to the LacO repeats. (B) Time lapse images of neuroblasts expressing GFP::LacI::Mre11 and H2Az::mRFP, mRFP::Rad50 or mCherry::Polo. Time: min:sec. Scale Bar=5 $\mu$ m. The insets present inverted images of the GFP::LacI::Mre11 spots (bottom insets) and mRFP::Rad50 or mCherry::Polo (top insets), scale bar=1 $\mu$ m. (C) Model for the DNA Damage Response (DDR) in mitosis. The presence of double strand breaks (DSB) triggers the recruitment of the MRN complex and activation of ATM. Both MRN and ATM promote the robust accumulation of Polo to DSB. Polo, in turn, facilitates the recruitment of the complex BubR1/Bub3, which inhibits the APC/C locally by sequestering Fzy at the site of damage.



## Supplementary data

### Figure legends

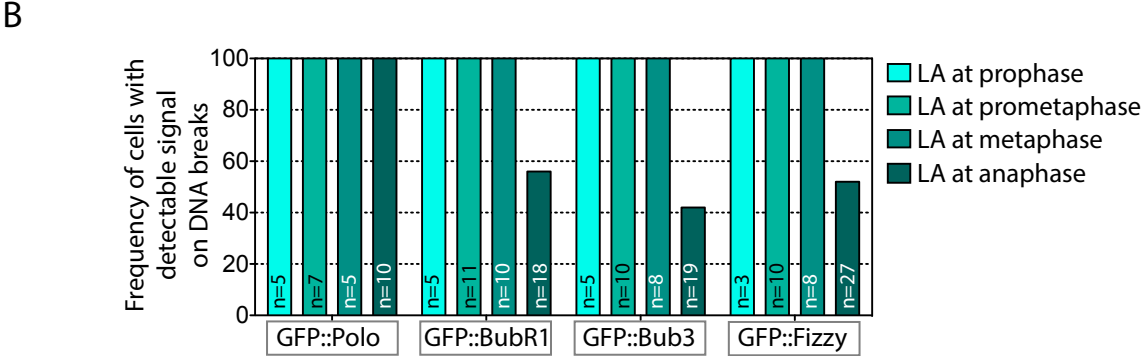
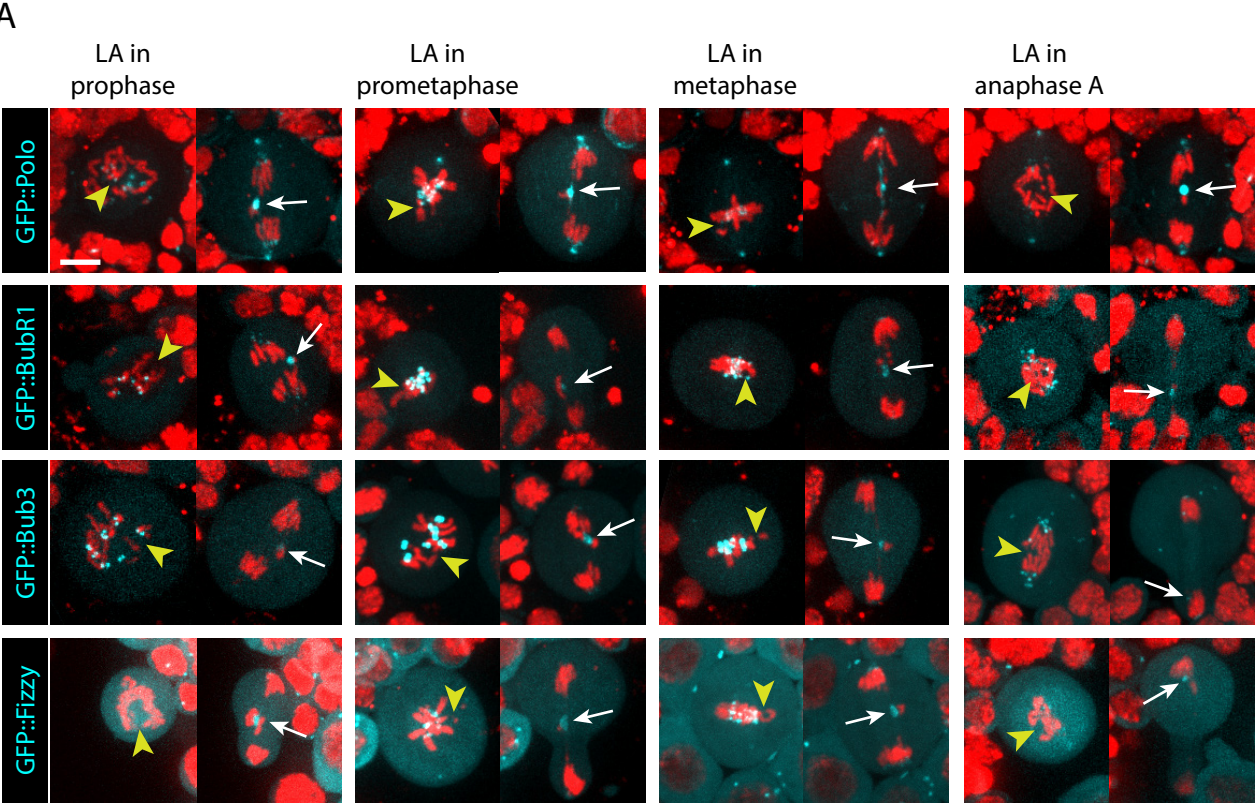
**Figure S1. The Polo-dependent phosphorylation residues of the BubR1 KARD sequence are not required for the recruitment of BubR1 to DSB.** (A) Schematic representation of BubR1 with the relative position of the KEN motif, Bub3 binding domain (Bub3-BD) and Kinase domain as well as the sequence alignment of the Kinetochores Attachment and Regulatory Domain (KARD) as published by (Suijkerbuijk et al., 2012). Phosphorylated residues are indicated in cyan. The numbers indicate the position based on the sequence of the fruitfly BubR1. The conserved residues S685, S691 and S695 of the *Drosophila* BubR1 KARD motif are mutated either with alanine (BubR1-KARD-A) or aspartic acid (BubR1-KARD-D). (B) Scatter dot-plot showing the appearance of BubR1 full length (FL), Bub3-BD, BubR1-KARD-A and BubR1-KARD-D on laser-induced breaks after laser ablation. The lines correspond to mean $\pm$ CI95%.

**Figure S2. Okra does not localize on laser-induced DSB during mitosis.** (A) Time lapse images of neuroblasts expressing H2Az::mRFP and Okra::GFP after laser ablation. The yellow arrowheads indicate the site of laser ablation. Cell #1 is in mitosis and cell #2 is in interphase. Cells are monitored within few seconds after laser ablation (time 0:00). Okra::GFP signal appears after 3 minutes following DNA damage in the interphase nuclei (white arrow). In contrast, no Okra::GFP signal is detected on DNA breaks in mitotic cells. The white dashed lines highlight the contour of the cells. Time: min:sec. Scale Bar=5 $\mu$ m.

**Figure S3. GFP::LacI::Mre11 co-localizes with mRFP::Rad50 on laser-induced DSB during mitosis.** (A) Time lapse images of neuroblasts expressing GFP::LacI::Mre11 (Top row, red in merge) and mRFP::Rad50 (middle row, cyan in merge) after laser ablation. The yellow arrowhead indicates the site of laser ablation. The red and cyan arrows point to the appearance of the GFP::LacI::Mre11 and mRFP::Rad50 respectively. Both proteins co-localize at the site of damage within 20 seconds following laser ablation. AO: anaphase onset. Time: min:sec. Scale

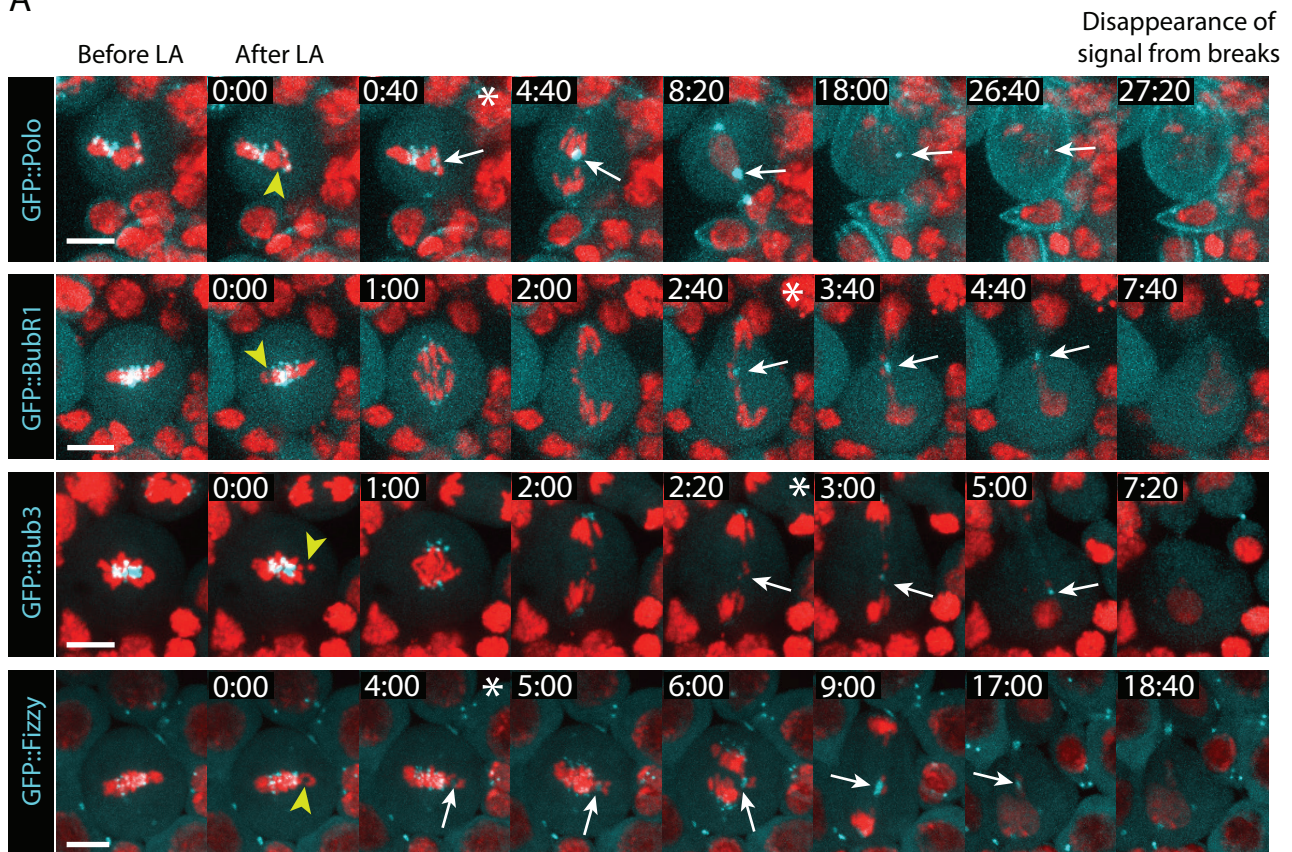
Bar=5 $\mu$ m. Note that both proteins co-localize in a large cytoplasmic aggregate present in all cells (white arrow in merge).

Figure 1

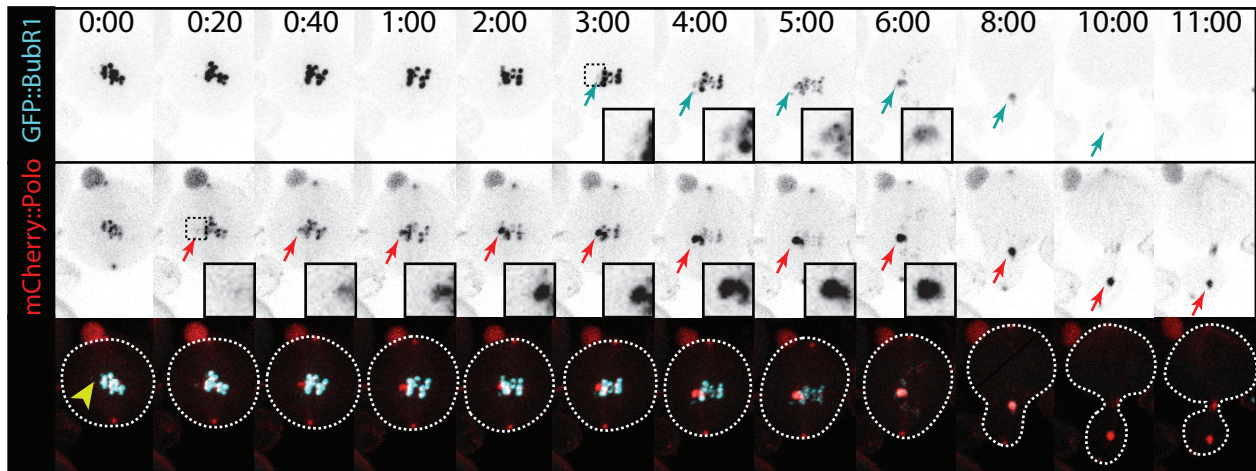


# Figure 2

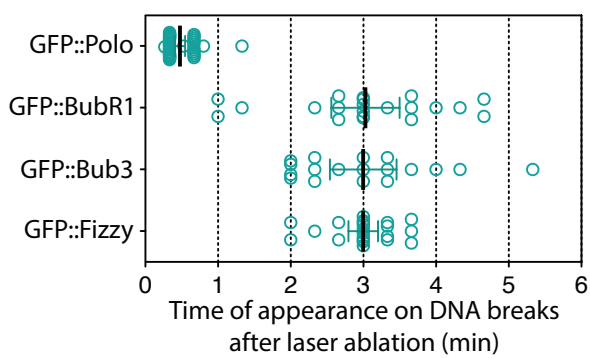
A



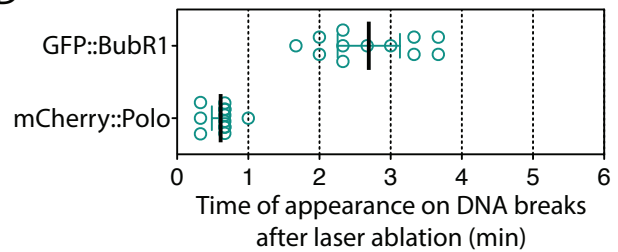
B



C



D



E

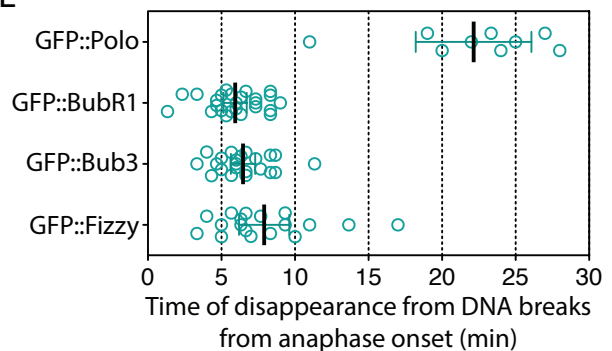
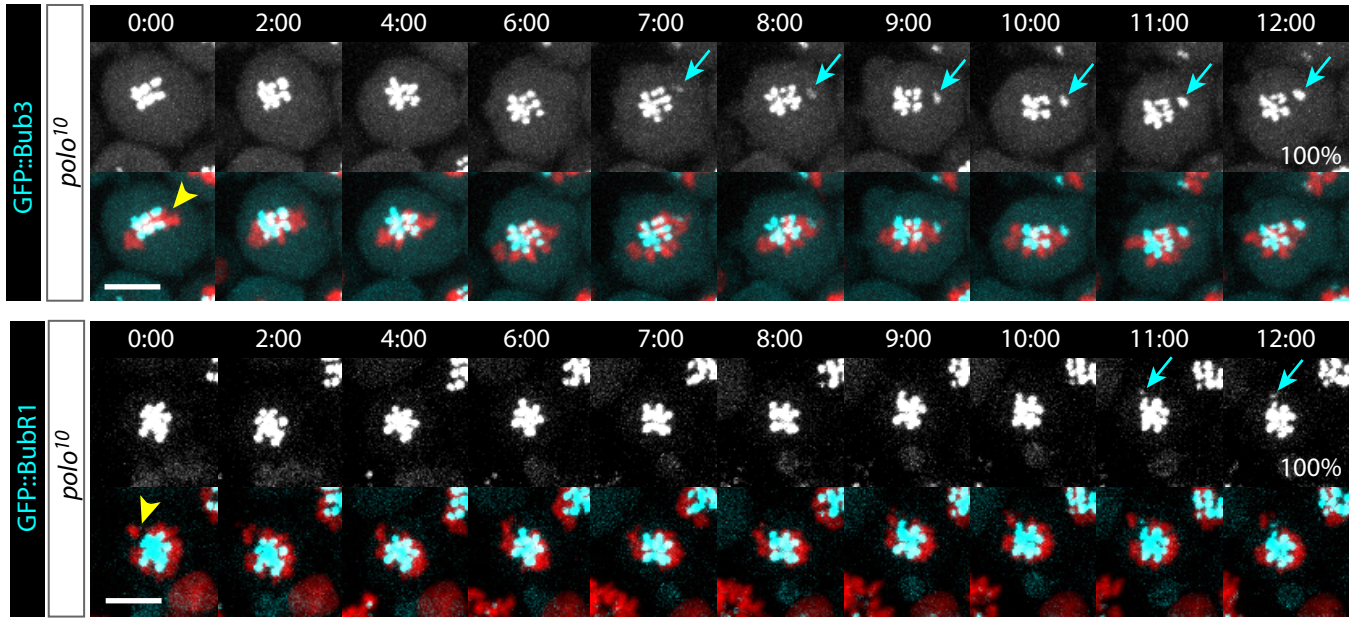


Figure 3

A



B

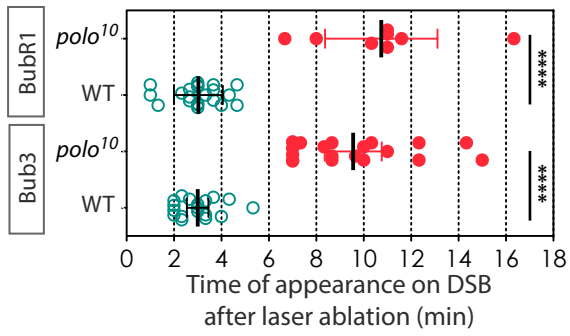


Figure 4

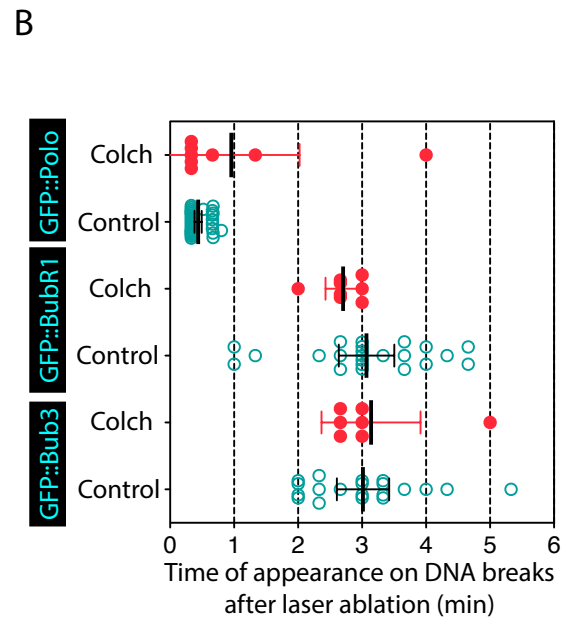
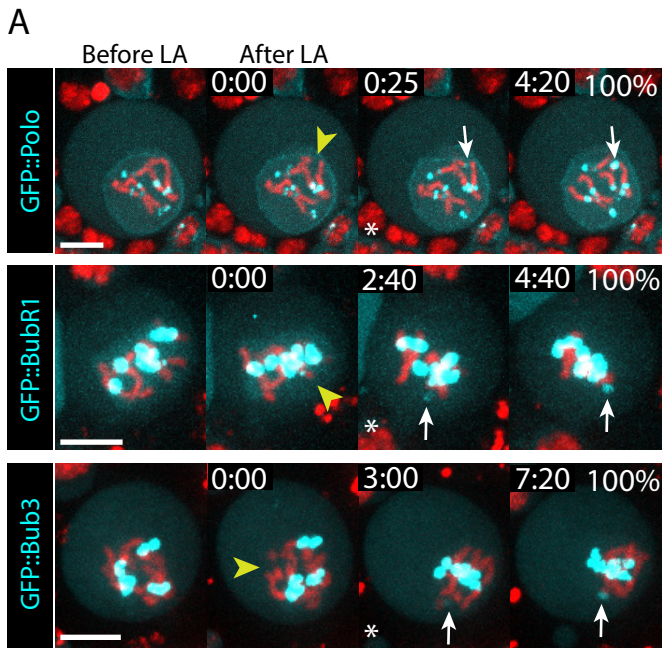
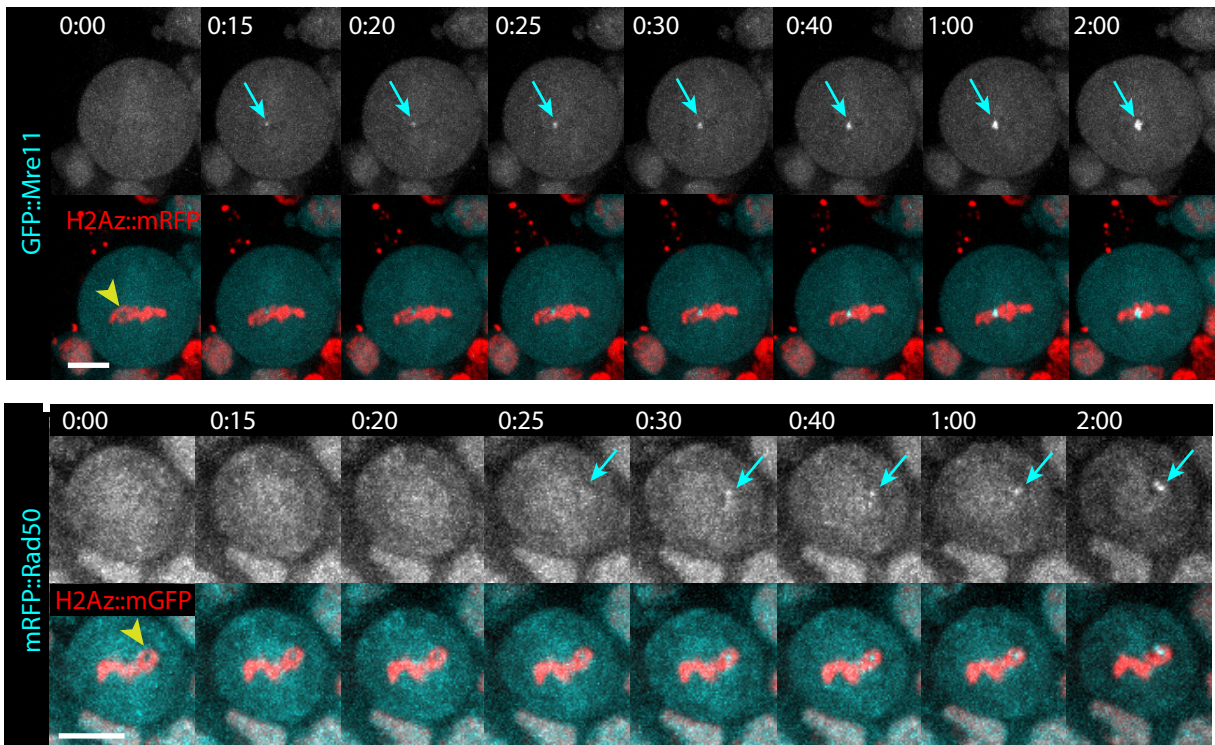
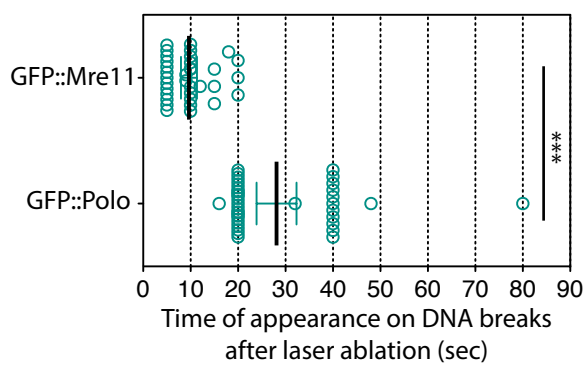


Figure 5

A



B



C

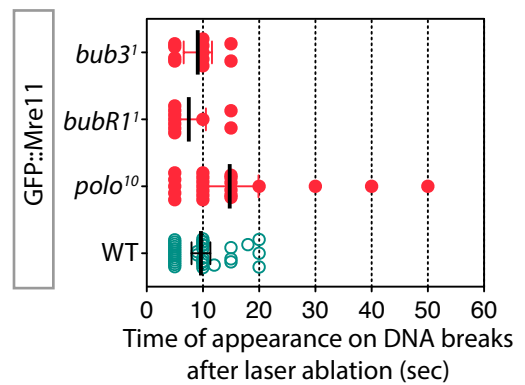


Figure 6

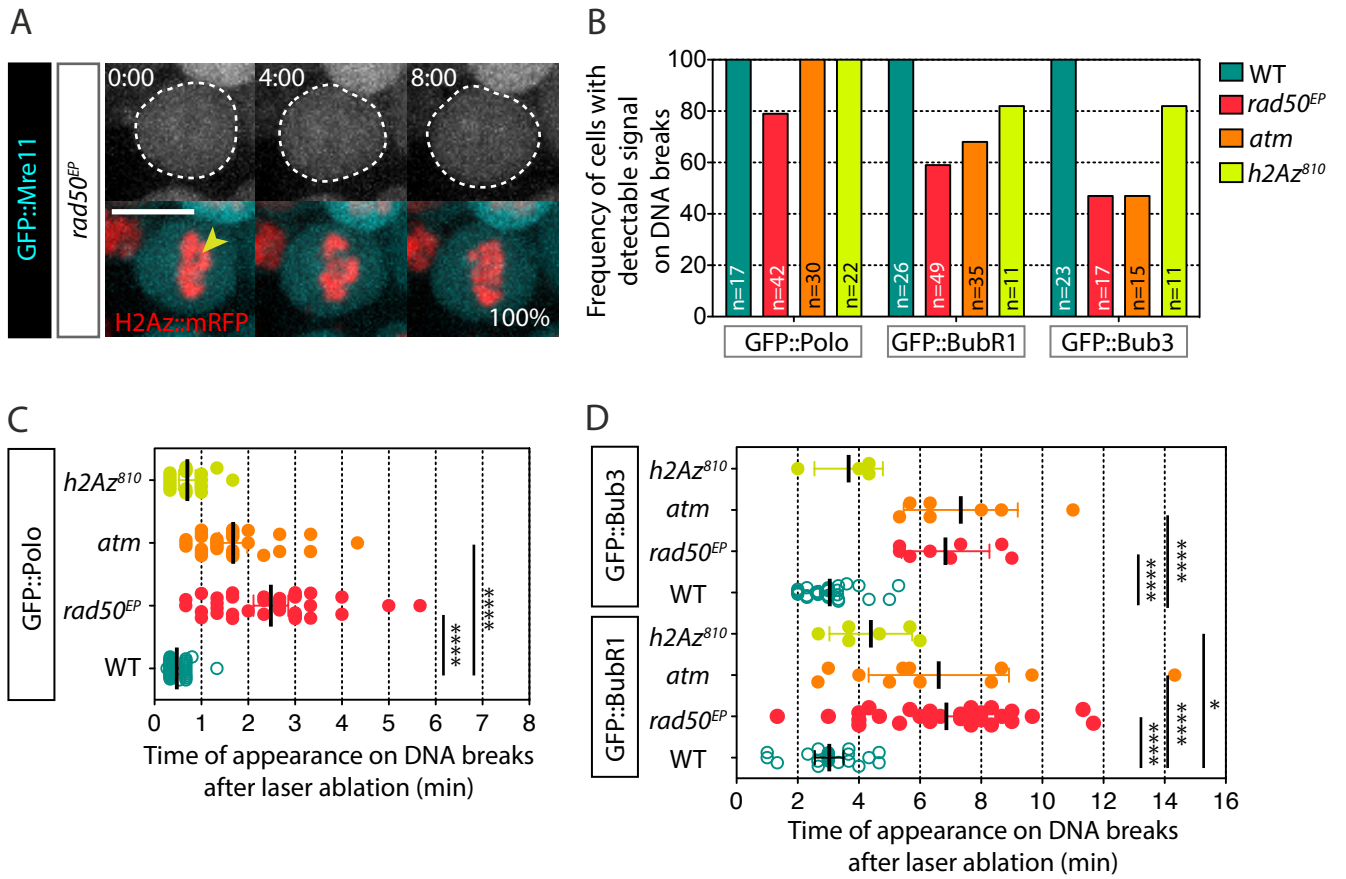




Figure 7

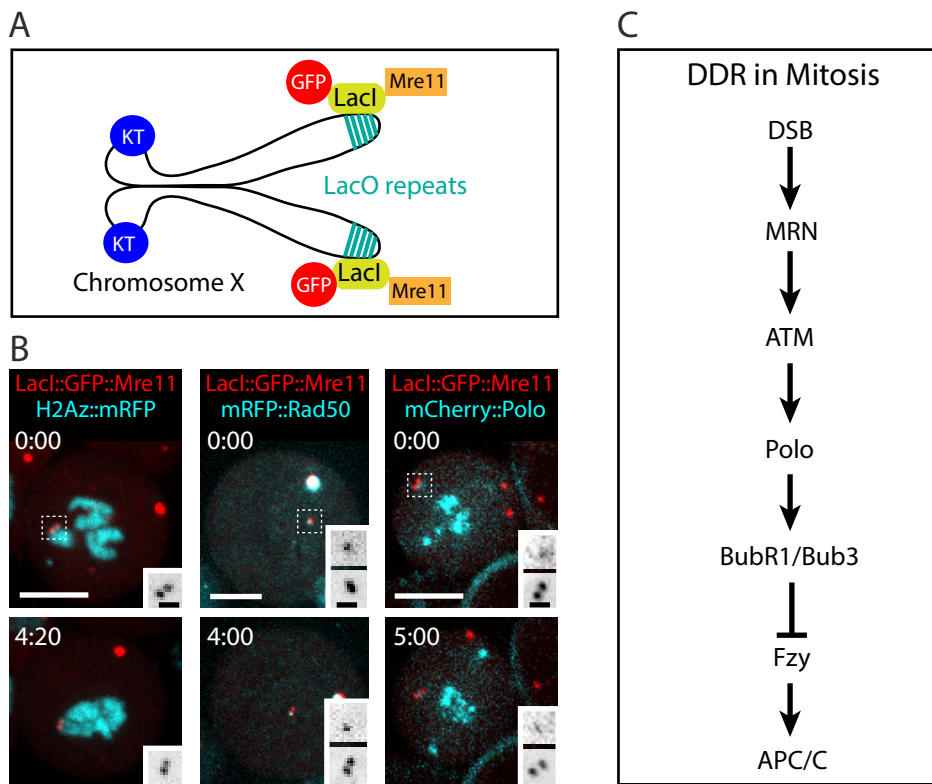


Figure S1

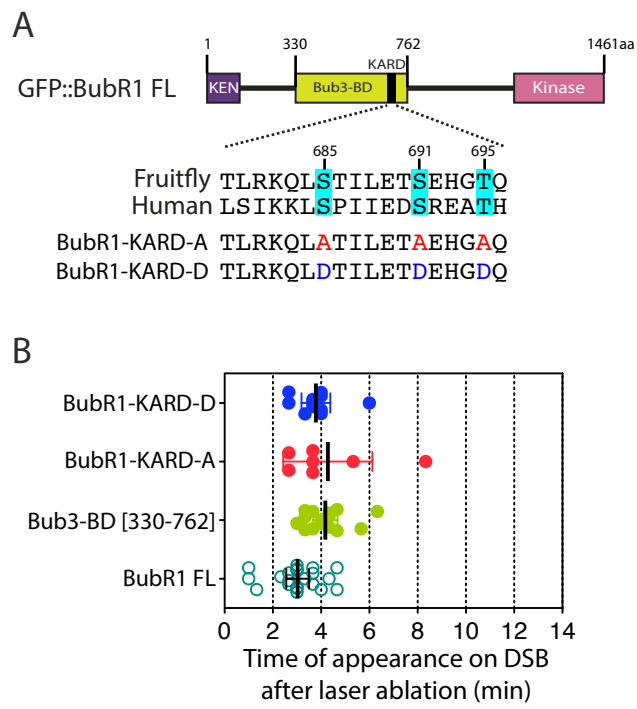


Figure S2

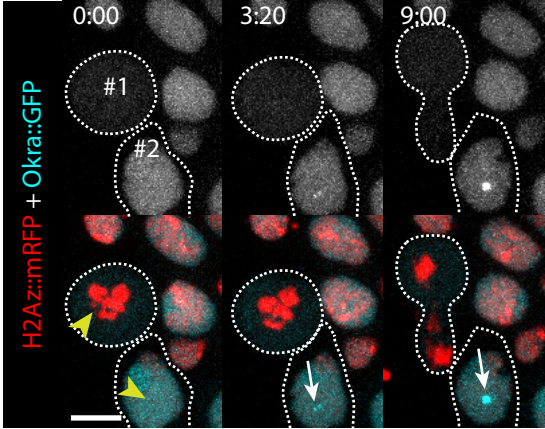
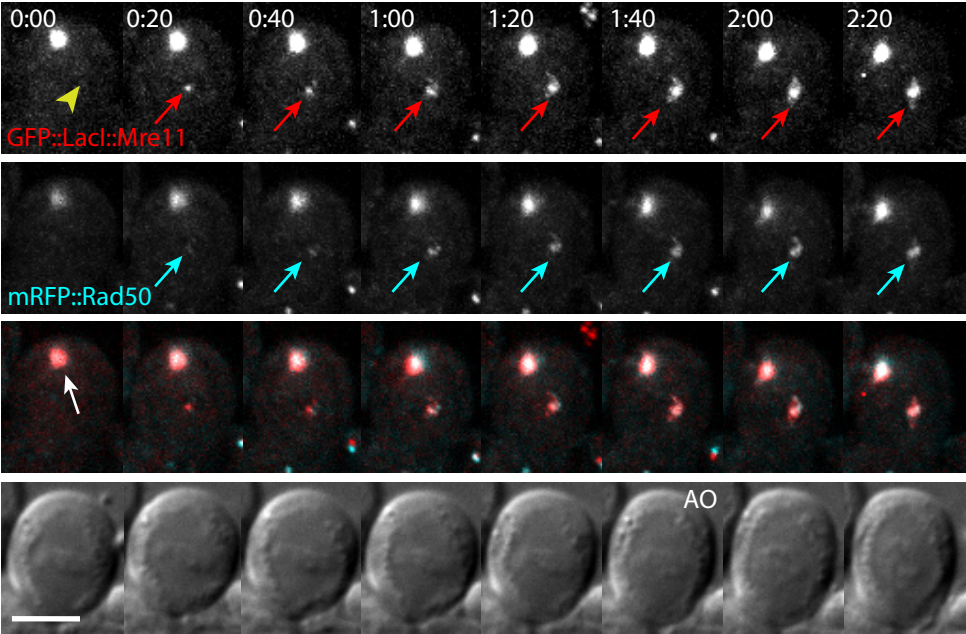


Figure S3



### III. Résultats complémentaires

#### A. Le CPC est recruté sur les cassures de chromosomes en mitose

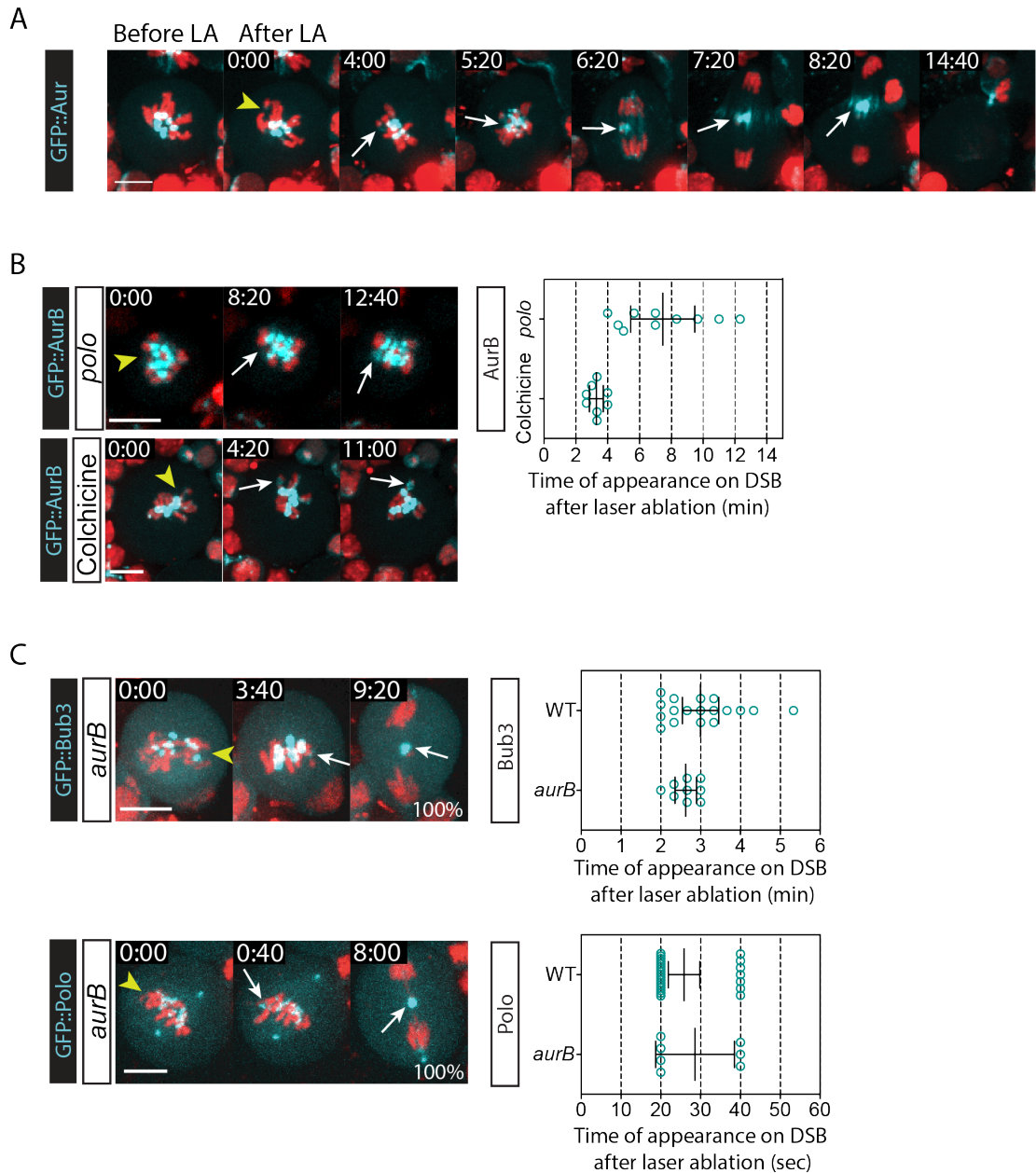
Nous avons montré précédemment qu'Aurora B et ses partenaires du CPC (chromosomal passenger complex), Incenp et Survivin, se localisent aux cassures induites par l'endonucléase I-CreI (Royou et al. 2010). Pour déterminer la dynamique de recrutement d'Aurora B sur les lésions à l'ADN, nous avons réalisé des expériences d'ablation par laser de chromosomes dans des neuroblastes en mitose et nous avons suivi par vidéomicroscopie à l'aide d'un spinning disk le recrutement de Aurora B taguée GFP. Aurora B est recrutée sur les cassures de chromosomes dans 100% des cellules observées (Figure 1 A). Cependant, la dynamique de recrutement est difficile à évaluer car Aurora B est présente sur la chromatine, les kinétochores et le fuseau central (voir 'A. Localisation et recrutement du CPC' p47). En revanche, nous avons pu observer une différence marquante de la dynamique d'Aurora B par rapport à celle de Polo, BubR1 et Bub3. En effet, contrairement à Polo, BubR1 et Bub3, le signal d'Aurora B aux cassures se relocalise au fuseau central en anaphase pour y rester jusqu'en fin de mitose (Figure 1 A).

Nous avons ensuite évalué le rôle des microtubules dans le recrutement de Aurora B sur les cassures de chromosomes. Nous avons induit la dépolymérisation des microtubules en traitant les cerveaux avec 10 $\mu$ M de colchicine pendant 30 minutes et avons observé la dynamique d'Aurora B après cassures de chromosomes par ablation laser. Nous observons qu'Aurora B est toujours recrutée sur les cassures de chromosomes en absence de microtubules. La colchicine induit un blocage de la cellule en prométaphase, ce qui nous a permis d'observer la dynamique de recrutement d'Aurora B. En l'absence de microtubules, Aurora B est recruté en 3 minutes sur les cassures de chromosomes (Figure 1 B). Ce temps d'apparition d'Aurora B aux cassures est similaire à celui de BubR1 et Bub3 (voir 'II. Article 2 : Mre11-Rad50-Nbs1 and ATM mediate the robust recruitment of Polo and BubR1/ Bub3 to DNA breaks during mitosis' p92).

Sachant que Polo assure le recrutement rapide et robuste de BubR1 et Bub3 aux lésions, nous avons voulu évaluer également le rôle de Polo dans le recrutement d'Aurora B sur les cassures. Ainsi nous avons suivi la dynamique d'Aurora B sur les cassures de

chromosomes induites par ablation laser dans un contexte mutant fortement hypomorphe de *polo*. Aurora B est toujours recrutée aux cassures lorsque l'activité de Polo est fortement diminuée. Les cellules restent bloquées en prométaphase dans ce mutant *polo*, ce qui nous a permis d'observer la dynamique de recrutement d'Aurora B aux cassures. Aurora B est recrutée sur les cassures en moyenne 7 minutes après induction des cassures dans les mutants *polo* (Figure 1 B). Le temps d'apparition d'Aurora B aux cassures est significativement plus long dans les mutants *polo* que dans des cellules traitées à la colchicine. Ceci suggère que Polo facilite l'accumulation d'Aurora B aux cassures.

Nous avons ensuite voulu déterminer si Aurora B joue un rôle dans le recrutement de Polo et Bub3 sur les lésions d'ADN. Aurora B étant essentielle, nous avons utilisé une combinaison allélique hypomorphe d'*aurora B* qui permet d'atténuer fortement la fonction d'Aurora B dans les larves de troisième stades. Polo et Bub3 sont recrutées sur la cassure d'ADN dans toutes les cellules mutantes pour Aurora B. De plus, les dynamiques de recrutement de Polo et Bub3 sur les cassures ne sont pas affectées après l'atténuation de l'activité d'Aurora B (Figure 1 C). Ces résultats suggèrent qu'Aurora B ne joue pas de rôle majeur dans le recrutement de Polo et Bub3 aux DSB.



**Figure 1. Polo mediates the efficient recruitment of Aurora B to DNA breaks.**

(A) Representative time-lapse images of neuroblasts expressing H2Az::mRFP (red) and GFP::Survivin after laser ablation. The yellow arrowheads indicate the site of laser ablation. The cell is monitored within few seconds after laser ablation (time 0:00). The white arrow point to the localization of GFP::AurB on DNA breaks. Time=min:sec. Scale Bar=5 $\mu$ m. (B) Time lapse images of neuroblasts expressing H2Av::mRFP (red) and GFP::Aurora B in *polo* mutant (upper panel) or treated for 30 minutes with 10 $\mu$ M colchicine (bottom panel). The yellow arrowheads indicate the site of laser ablation. The cell is monitored within few seconds after laser ablation (time 0:00= min:sec). Scatter dot-plot showing the appearance of GFP::Aurora B on laser-induced breaks from laser

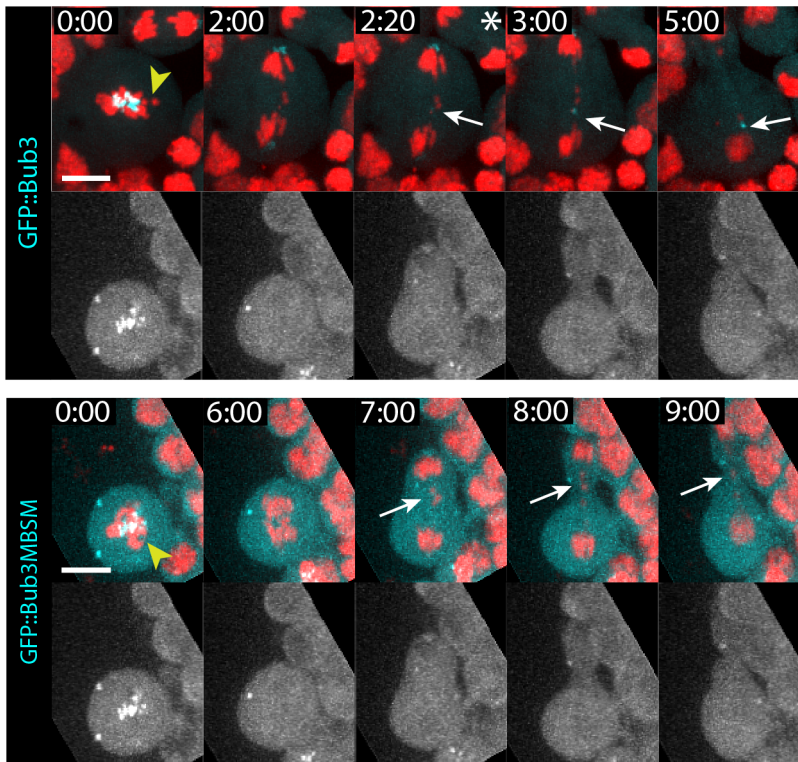
ablation in polo mutant cells and colchicine treated cells. The lines correspond to  $\text{mean} \pm \text{CI}95\%$ . (C) Time lapse images of neuroblasts expressing H2Av::mRFP (red) and GFP::Polo (top panel) or GFP::Bub3 (bottom panel) in *aurora B* mutant. The yellow arrowheads indicate the site of laser ablation. The cell is monitored within few seconds after laser ablation (time 0:00= min:sec). Scatter dot-plot showing the appearance of GFP::Polo and GFP::Bub3 on laser-induced breaks from laser ablation in control and *aurora B* mutant cells. The lines correspond to  $\text{mean} \pm \text{CI}95\%$ .



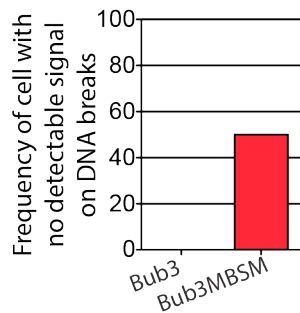
## B. Les sites d'attache de Bub3 aux motifs MELT sont nécessaires au recrutement efficace de Bub3 sur les cassures de chromosomes

Chez l'humain, le recrutement de BubR1 et Bub3 au kinétochore passe par une interaction directe entre Bub3 et des sites spécifiques de KNL1 appelés MELT qui sont phosphorylés préalablement par MPS1 et Plk1. Deux résidus permettant l'interaction avec les motifs MELT ont été identifiés chez Bub3 humain et il a été montré que leur mutation en alanine supprime la localisation de Bub3 sur les kinétochores (Primorac et al. 2013). Nous n'avons jamais détecté de signal Spc105 (l'homologue de KNL1 chez la Drosophile) sur les cassures induites par I-CreI ou ablation laser (Derive et al. 2015), ce qui suggère que Spc105 n'est pas impliqué dans le recrutement de BubR1 et Bub3 sur les cassures de chromosomes. Il est cependant envisageable qu'une autre protéine contenant des séquences MELT soit impliquée dans le recrutement de Bub3 aux lésions. Nous avons donc évalué l'importance de ces sites de reconnaissance des séquences MELT phosphorylées. Pour ce faire, nous avons étudié la dynamique d'une construction GFP::Bub3 dont les deux sites putatifs d'attache aux séquences MELT sont mutés en alanine (GFP::Bub3MBSM) après laser ablation. Le recrutement de Bub3MBSM sur les cassures de chromosomes est altéré (Figure 2 A et B). Seules 50% des cellules présentent un recrutement de Bub3MBSM aux cassures, et le temps d'apparition de Bub3 aux cassures est significativement retardé dans ces cellules (Figure 2 C).

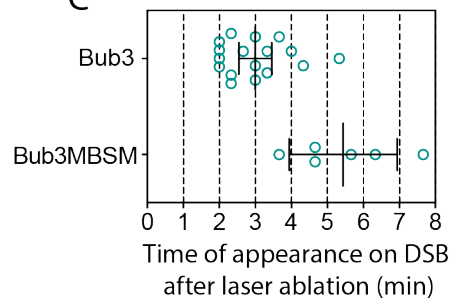
A



B



C



**Figure 2. The robust recruitment of Bub3 to DNA breaks in mitosis depends on Bub3-MELT binding sites.** (A) Time lapse images of neuroblast expressing H2A::mRFP and GFP::Bub3 or GFP::Bub3MBSM after laser ablation. The yellow arrowheads indicate the site of laser ablation. The cell is monitored within few seconds after laser ablation (time 0:00). The white arrows point to the localisation of GFP ::Bub3 signal on DSBs in the top panel. The white arrows point to the localisation of the broken fragment in the bottom panel. No GFP::Bub3MBSM signal was detected on DNA breaks in 50% (n=16). Time: min:sec. Scale Bar=5 $\mu$ m. (B) Frequency of cells with no detectable signal of GFP::Bub3 or GFP::Bub3MBSM on DNA breaks. (C) Scatter dot-plot showing the appearance of GFP::Bub3 or GFP::Bub3MBSM on laser-induced breaks from laser ablation. The line corresponds to mean $\pm$ CI95%.

## C. Rôle des sites putatifs de phosphorylation par Polo sur le Bub3 binding domain de BubR1

Nous avons mis en évidence que le recrutement de BubR1 sur les cassures de chromosomes est retardé en absence de Polo (voir 'II. Article 2 : Mre11-Rad50-Nbs1 and ATM mediate the robust recruitment of Polo and BubR1/ Bub3 to DNA breaks during mitosis' p92). De plus, nous avons montré que le Bub3-BD (Bub3 Binding Domain) de BubR1 est suffisant et nécessaire au recrutement de BubR1 sur les cassures de chromosomes (Derive et al. 2015). Sachant que chez l'humain, BubR1 est un substrat connu de Plk1 (Elowe et al. 2007), nous avons donc émis l'hypothèse que le Bub3-BD de BubR1 pourrait être phosphorylé par Polo afin de promouvoir son recrutement sur les cassures de chromosomes. Polo est une sérine/thréonine kinase qui phosphoryle ses substrats préférentiellement sur un site consensus qui est [D/E]-X-[S/T]. Nous avons identifié 7 Sérine/thréonine (S/T) putatifs de phosphorylation par Polo dans le Bub3-BD (Figure 15 A : Résidus en cyan), notamment la sérine 581 qui a été identifiée comme étant phosphorylé *in vivo* par un crible protéomique de phosphopeptides dans des extraits d'embryons de *Drosophila* (Zhai et al. 2008). Nous avons testé le rôle de ces sites putatifs de Polo dans le recrutement de BubR1 aux cassures en mutant les S/T en alanine, résidu non phosphorylable. Nous avons, tout d'abord, réalisé deux constructions : GFP::Bub3-BD-N3A ayant les trois S/T mutées en position N-terminale, et GFP::Bub3-BD-C4A ayant les quatre sites en position C-terminale mutés (Figure 3 A bas). Nous avons ensuite comparé la dynamique de ces constructions avec celle du Bub3-BD au niveau des cassures induites en prométaphase par laser ablation. Il est à noter que BubR1-BD possède une dynamique similaire à BubR1 quoique légèrement retardée (voir partie 2 des résultats). Nous observons que la construction Bub3-BD-N3A est recrutée sur les cassures de chromosomes dans tous les cas et avec une cinétique similaire à Bub3-BD (Figure 3 A et B). En revanche, la construction Bub3-BD-C4A n'est recrutée sur les cassures de chromosomes que dans un quart des cellules (Figure 3 B). De plus, lorsque le signal est détecté, il apparaît tardivement dans 2 cellules sur 5. D'autre part, Bub3-BD-C4A ne se localise pas aux cassures induites par l'endonucléase I-CreI (données non publiées).

Pour déterminer si la phosphorylation de ces sites permet de restaurer la localisation du Bub3-BD sur les cassures, nous avons étudié le recrutement du Bub3-BD ayant les 4 sites C-terminaux mutés en acide aspartique (Bub3-BD-C4D), pour mimer l'effet d'une phosphorylation. Nous observons l'apparition d'un signal Bub3-BD-C4D sur la chromatine endommagée dans une large majorité de cellules (Figure 3 D). D'autre part, Bub3-BD-C4D est recrutée sur les cassures de chromosome avec une dynamique légèrement plus rapide que Bub3-BD et similaire à BubR1 full length (voir partie résultats 2, Figure 3 E). Ces résultats vont dans le sens d'un modèle où la phosphorylation de l'un ou plusieurs de ces résidus par Polo faciliterait le recrutement de BubR1 sur les cassures.

Si le recrutement de BubR1 aux cassures est assuré uniquement par la phosphorylation de l'un de ces 4 sites C terminaux de son Bub3-BD par Polo, alors la substitution de ces résidus en résidus phosphomimétiques serait suffisante pour localiser promptement BubR1 aux cassures en l'absence de Polo. Pour tester cette hypothèse nous avons analysé la dynamique de Bub3-BD-C4D dans les mutants *polo*<sup>10</sup> où l'activité de polo est fortement diminuée. Nous avons observé que, de façon similaire à BubR1, le recrutement de Bub3-BD et de Bub3-BD-C4D est retardé dans les mutants *polo*<sup>10</sup> (Figure 3 E). Ainsi la substitution de ces résidus en phosphomimétiques ne permet pas de compenser la perte d'activité de Polo dans le recrutement de BubR1 aux cassures.

Plusieurs hypothèses peuvent être émises pour expliquer ces résultats : (1) ces résidus ne sont pas phosphorylés *in vivo* mais leur substitution en alanine perturbe le repliement structural du domaine Bub3-BD et affecte ainsi sa localisation aux cassures. Le fait que le Bub3-BD-C4A se localise correctement aux kinétochores contredit cette hypothèse. (2) Ces résidus ne sont pas phosphorylés mais sont importants pour une interaction de BubR1 avec une autre protéine au niveau des cassures. (3) Ces sites sont phosphorylés *in vivo* par Polo et sont importants mais pas suffisants pour recruter BubR1 aux cassures. Polo pourrait aider au recrutement de BubR1 sur les cassures indirectement via la phosphorylation d'un ou plusieurs composants qui interagissent avec BubR1. (4) Enfin, il peut exister un autre site putatif de phosphorylation par Polo dans le Bub3-BD important pour sa localisation aux cassures.

Nous avons également évalué chacun des 4 résidus dans la dynamique de BubR1 aux cassures. Chaque site est substitué individuellement en alanine et les Bub3-BD ainsi mutés sont fusionnés à la GFP. Des neuroblastes de larve de *Drosophile* exprimant ces

GFP::Bub3-BD mutés sont observés par microscopie confocale à spinning disk. Nous observons que les substitutions de S581 et T604 en alanine n'affectent pas la dynamique de recrutement de Bub3-BD au niveau des cassures, indiquant que ces résidus ne sont pas importants pour la localisation de BubR1 aux lésions. En revanche, on observe une fraction significative de cellules où le signal de Bub3-BD n'est pas détecté aux cassures lorsque la T622 ou la T731 est mutée en alanine. Cette fréquence est plus élevée pour la mutation T622A et est similaire à celle observée lorsque les 4 résidus sont mutés (Figure 3 F). Lorsque le signal des mutants ponctuels est détecté aux cassures, leur dynamique est similaire à celle du Bub3-BD, avec cependant une plus grande variabilité pour les mutations T622A et T731A (Figure 3 G). Ainsi, les deux sites T622 et T731 semblent être importants pour le recrutement de Bub3-BD sur les lésions. Il est possible que les deux sites soient phosphorylés par Polo et contribuent au recrutement correct de BubR1 sur les cassures de chromosomes.

A



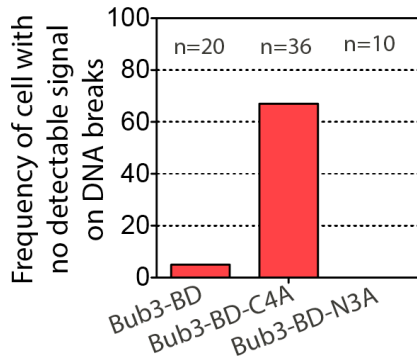
DEQAMPPITNYERRLEQPF RFP TNFVAKNR PQEPWVTPVTIEDEPNASGLPCYN  
 KLLLYPRPNI **EF**SPEEYRAYSFLKHRNPQHPFIHRNDDWWTGRVIRGIRCYPN  
 FARYSKPQDLDELDFWKPLV PGLQVVFDKIYNEVEQKEYKQP **E**ELLAAKWME  
 KRNVTVHGDFDME**ET**VCLPGNKMPRRKSFPPSSFRK SIMPRRVSSVQEEDEKKE  
 D**EAT**LIVKDI PSQVAPKIPESPCDQIDEPKIKIF **ED**SGSPRDNFAVPAVPVKI  
 EIY**ED**SEEPQTPKTRPFYD**DET**CSTQMFNMFIKSQAVSTPKGTQKQAPSRQF  
 GTVLKELPLPEEAH SVESPVETRSP TLRKQL**S**TILETSEHGTQSLATSGTTTK  
 STITSTSSPGSNAVSKLGSKIE**ENT**PGQMRLQRVISAGVSAVLSEPEKPGGDNFLR

Bub3-BD-N3A: S396A, T505A, T549A

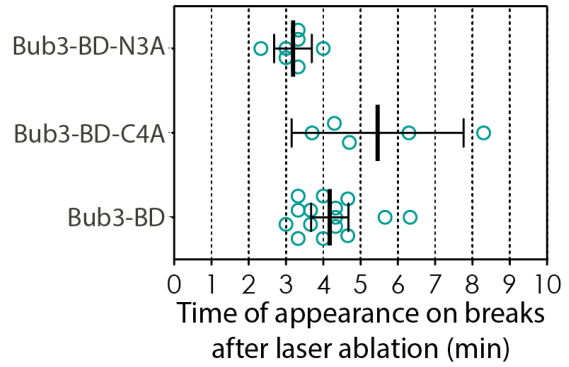
Bub3-BD-C4A: S581A, S604A, T622A, T731A

Bub3-BD-C4D: S581D, S604D, T622D, T731D

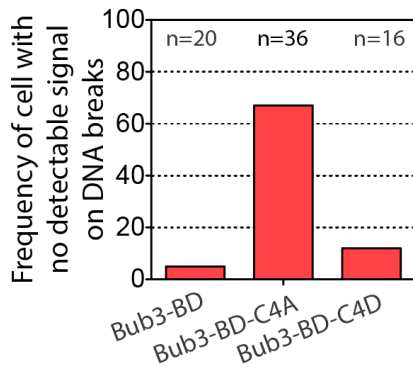
B



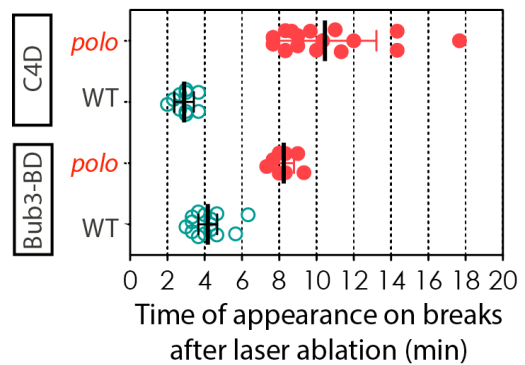
C



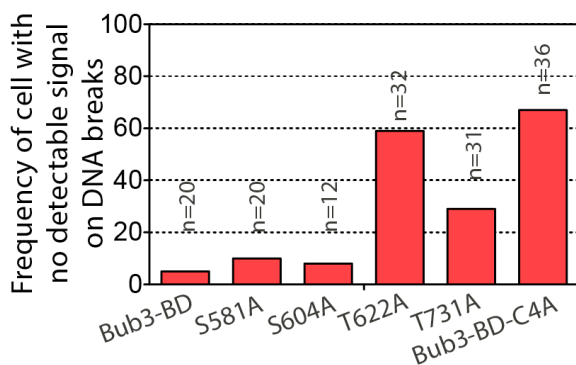
D



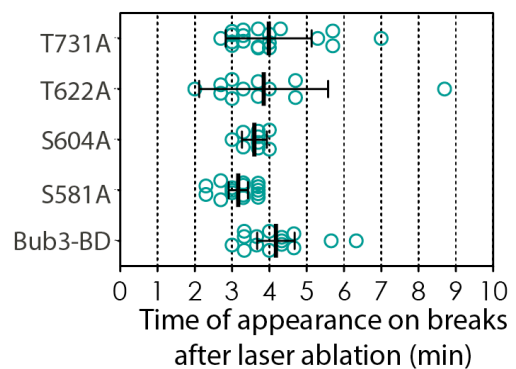
E



F



G



**Figure 3. The threonines 622 and 731 in the Bub3-BD are important for the efficient recruitment of BubR1 to DSB.** (A) Schematic representation of BubR1 domains with the sequence of the Bub3 Binding Domain. The red glutamate corresponds to residue required for the BubR1 interaction with Bub3. The blue serine corresponds to the conserved serine in the KARD motif. Putative Polo-dependent phosphorylation sites are indicated in Cyan. The numbers indicate the position of the residues in the Drosophila BubR1 sequence. The residues S581, S604, T622 and T731 are mutated either with alanine or aspartic acid. Strains expressing these point mutation Bub3-BD constructs fused with GFP are used for our live analysis. (B) Frequency of cells with a detectable signal of the indicated constructs on DNA breaks after laser ablation. (C) Scatter dot-plot showing the appearance of the indicated constructs on laser-induced breaks after laser ablation. The lines correspond to mean $\pm$ CI95%. (D) Frequency of cells with a detectable signal of the indicated constructs on DNA breaks. (E) Scatter dot-plot showing the appearance of GFP::Bub3-BD and GFP::Bub3-BD-C4D on laser-induced breaks after laser ablation in WT and *polo*<sup>10</sup> mutant. The lines correspond to mean $\pm$ CI95%. (F) Frequency of cells with a detectable signal of the indicated constructs on DNA breaks. (G) Scatter dot-plot showing the appearance of the indicated constructs on laser-induced breaks after laser ablation. The lines correspond to mean $\pm$ CI95%.





# **Discussion et conclusion**



# I. Mécanisme de recrutement de Polo sur les cassures

Nous avons montré que Polo est rapidement recruté sur les cassures d'ADN et que ce recrutement est favorisé par des protéines de la DNA damage response (DDR) telles que Rad50 du complexe MRN ou ATM. Cependant, le mécanisme moléculaire par lequel le complexe MRN et ATM facilitent le recrutement de Polo aux cassures d'ADN reste à élucider.

## A. Les condensines

Plusieurs données peuvent laisser penser que les condensines I et II pourraient jouer un rôle dans la localisation de Polo sur les cassures en mitose. Les condensines sont des complexes protéiques composés de deux sous-unités principales SMC2 et SMC4 et de 3 sous-unités régulatrices, CAP-H, CAP-G, et CAP-D2 pour la condensine I, et CAP-H2, CAP-G2, et CAP-D3 pour la condensine II (Abe et al. 2011). Ces complexes ont pour fonction principale de réguler la compaction de l'ADN. Ils participent également à la réponse aux dommages à l'ADN (Aono et al. 2002; Sakamoto et al. 2011). Une étude récente a mis en évidence que CAP-G2 et CAP-D3, des sous-unités du complexe condensine II chez l'homme, participent au recrutement de PLK1 au kinétochore. CAP-G2 est phosphorylée sur la Thr1010, ce qui génère un site d'attachement pour le PBD de PLK1 et ainsi le recrutement de Plk1 aux kinétochores (J. H. Kim et al. 2014). Il a également été montré que CDK1 phosphoryle la Thr1415 de CAP-D3, ce qui promeut le recrutement de PLK1 sur les chromosomes *via* l'attachement sur CAP-D3 (Abe et al. 2011). Il n'existe pas d'homologue connu de CAP-G2 chez la Drosophile et l'existence du complexe condensine II est indéterminée (Green et al. 2012). Cependant, cette fonction de recrutement de Polo à la chromatine pourrait être prise en charge par d'autres sous-unités de condensines. Nous avons observé une accumulation spécifique de deux sous-unités de condensine I, Barren (Cap-H) et Cap-G sur les cassures induites par laser ablation dans les neuroblastes de drosophiles (données non publiées). Ainsi les condensines I pourraient faciliter l'accumulation de Polo sur les cassures. Pour évaluer l'importance des condensines I ou/et II sur le recrutement de Polo au niveau des lésions d'ADN en mitose, la dynamique de Polo devrait être étudiée dans des cellules déplétées

pour les condensines I ou/et II. Des lignées de Drosophiles exprimant des RNAi dirigés contre différentes sous unités des condensines telles que CAP-D2, CAP-H2 sont disponibles. Il existe également des lignées de Drosophiles ayant des mutations entraînant une perte de fonction des gènes SMC2 ou SMC4.

## B. ATM

Nous avons observé une diminution de l'efficacité du recrutement de Polo lorsque l'activité d'ATM est atténuée. ATM est une sérine/thréonine kinase dont le site consensus est (S/T)-Q. Il existe un site (S/T)-Q dans la séquence de Drosophile de Polo. Ainsi, nous pouvons spéculer qu'ATM favorise le recrutement de Polo via sa phosphorylation directe. Cependant, une étude protéomique des substrats phosphorylés par ATM en présence de dommage à l'ADN chez la souris n'a pas identifié PLK1 comme substrats d'ATM (Pines et al. 2011).

Il est également possible qu'ATM recrute indirectement Polo aux cassures via l'interaction de Polo avec des substrats préalablement phosphorylés par ATM. En effet, certains substrats phosphorylés par ATM présentent la séquence consensus Ser-(pThr/pSer)-(Pro/X) de reconnaissance des PBD de Polo. Ces sites sont retrouvés notamment dans les substrats d'ATM qui sont BRAC1, Chk1 ou WNR (Werner Syndrome helicase) (S. T. Kim et al. 1999). Il serait maintenant intéressant de déterminer parmi la liste de substrats déjà identifiés d'ATM, ceux qui présentent un site de fixation à la PBD et de tester ces candidats pour leur localisation aux cassures en mitose et l'effet de leur déplétion sur la dynamique de Polo aux DSB.

## C. Identification de protéines permettant le recrutement de Polo

Il serait également intéressant de rechercher le motif Ser-(pThr/pSer)-(Pro/X) dans les protéines recrutées sur les cassures d'ADN. De plus, ce motif correspond à la séquence consensus phosphorylée par CDK1 (pThr/pSer)-Pro). L'identification d'une protéine recrutée sur le tether et phosphorylée par CDK1 en ferait un bon candidat pour

le recrutement de Polo. Nous avons identifié plusieurs protéines de la DDR, autres que le MRN, qui se localisent aux cassures en mitose (données non publiées). Ces protéines pourraient être des candidats potentiels pour le recrutement de Polo. Il s'agit maintenant d'étudier l'effet de leur déplétion sur le recrutement de Polo aux cassures en mitose.

## II. Mécanisme de recrutement de BubR1, Bub3 et CDC20 aux cassures en mitose

Nous avons montré que la localisation de BubR1 sur les cassures d'ADN induites par I-CreI ou ablation laser dépend de son interaction avec Bub3. Ces deux protéines séquestrent ensuite CDC20. Les composants en amont qui interagissent directement avec BubR1/Bub3 au niveau des lésions restent à identifier. Chez la levure et les mammifères, l'interaction de BubR1 et Bub3 avec KNL1 joue un rôle important dans leur recrutement au kinétochore (Kiyomitsu, Obuse, and Yanagida 2007; Kiyomitsu, Murakami, and Yanagida 2011; D'Arcy et al. 2010; Revue : Victor M. Bolanos-Garcia and Blundell 2011). Chez la Drosophile, il a été montré que la suppression de Spc105 ne réduisait que partiellement le recrutement de BubR1 au kinétochore (Schittenhelm, Chaleckis, and Lehner 2009). Ces données suggèrent qu'il existe une voie alternative de recrutement de BubR1 et Bub3 sur les kinétochores, qui pourrait également être impliquée dans le recrutement de BubR1 et Bub3 sur les cassures d'ADN. Cependant, nous avons montré que la dynamique de BubR1 et Bub3 était différente entre les cassures d'ADN et le kinétochore. En effet, BubR1 et Bub3 restent sur la cassure jusqu'en télophase alors qu'elles sont dissociées du kinétochore à la transition métaphase/anaphase. De plus, ces deux protéines peuvent être recrutées sur les cassures lors de l'anaphase. Il est donc possible que le recrutement de BubR1 et Bub3 sur les cassures de chromosomes et sur les kinétochores passent par des voies différentes. Il est également possible que le ou les composants qui interagissent avec BubR1/Bub3 aux kinétochores et aux cassures soient le même, mais soumis à des voies de régulation différentes.

## A. Régulation du recrutement du complexe via Bub3

Chez l'humain, Bub3 possède deux résidus reconnaissant les motifs MELT de KNL1 et permettant l'interaction de Bub3 avec KNL1. Ces deux résidus de fixation des motifs MELT sont conservés chez la Drosophile. Nous avons montré que la mutation en alanine de ces résidus chez la Drosophile retarde ou empêche le recrutement de Bub3 sur les cassures d'ADN. Il serait intéressant d'identifier parmi les protéines recrutées sur les cassures en mitose, les protéines contenant des séquences MELT et de tester leur rôle dans le recrutement de Bub3 et BubR1.

Nous avons montré que Polo est requis pour le recrutement correct de Bub3 sur les cassures de chromosomes. Il est possible que Polo favorise le recrutement de Bub3 sur les cassures d'ADN en phosphorylant les sites MELT d'une protéine localisée sur les cassures d'ADN.

## B. Régulation du recrutement du complexe via BubR1

Polo phosphoryle BubR1 sur plusieurs résidus afin de réguler les différents rôles mitotiques de BubR1, tels que la stabilisation des attachements kinétochores-microtubules et la signalisation du SAC. Nous avons montré que Polo favorise le recrutement de BubR1 sur les cassures de chromosomes. Nous avons donc essayé d'identifier quels sites sur BubR1 pourraient être phosphorylés par Polo. Le Bub3 Binding Domain de BubR1 est suffisant et nécessaire pour la localisation de BubR1 sur les cassures de chromosomes. Nous avons identifié 7 sites correspondant au motif consensus phosphorylé par Polo. La mutation des 4 sites situés en C-terminal du Bub3-BD en alanine (non phosphorylable) altère le recrutement de ce domaine sur les cassures. La mutation de ces résidus en acide aspartique (phosphomimétique) restaure la dynamique de recrutement du Bub3-BD (voir section "C. Rôle des sites putatifs de phosphorylation par Polo sur le Bub3 binding domain de BubR1" p137). Ces résultats permettent de penser que l'un ou plusieurs de ces sites sont phosphorylés pour permettre un recrutement efficace sur les cassures. Cependant, la dynamique de la construction Bub3-BD-C4D dans un mutant *polo* est toujours altérée, ce qui suggère que Polo régule le recrutement de BubR1 autrement qu'en phosphorylant simplement ces domaines. Il est possible que Polo

régule le recrutement de BubR1 via la phosphorylation de ces sites, mais qu'elle soit également impliquée dans le recrutement d'une protéine en amont de BubR1. Cette hypothèse expliquerait que Bub3-BD-C4D soit recrutée correctement dans un contexte sauvage, mais pas dans un contexte Polo mutant. Il serait donc intéressant d'identifier de potentielles protéines recrutées en amont de BubR1 sur les cassures de chromosomes.

### III. Régulation du complexe BubR1, Bub3 et CDC20 sur les cassures de chromosomes

#### A. Inhibition locale de l'APC/C par BubR1, Bub3 et CDC20

Nous avons montré que le complexe BubR1/Bub3/CDC20 inhibe localement l'APC/C autour des cassures de chromosomes, potentiellement pour protéger un ou plusieurs substrats requis pour la ségrégation correcte des chromosomes cassés (Derive et al. 2015). Nous ne retrouvons pas MAD2 sur les cassures de chromosomes, nous avons donc une inhibition de l'APC/C par un complexe inhibiteur de type BBC (BubR1/Bub3/CDC20) et non pas de type MCC (MAD2/BubR1/Bub3/CDC20) (voir section "iii. Inhibition de l'APC/C" p24). Le BBC est moins efficace que le MCC pour inhiber l'APC/C (Kulukian, Han, and Cleveland 2009). La formation de BBC plutôt que de MCC au niveau des cassures de chromosomes pourrait être expliquée par le fait que la formation de MCC bloquerait l'entrée de la cellule en anaphase. En effet, il a été montré que la présence d'un seul kinétochore non attaché est suffisant à bloquer une cellule en métaphase (Rieder et al. 1995). La formation de BBC serait donc préférable pour générer un signal n'inhibant l'APC/C que localement, et permettant à la cellule de poursuivre la mitose.

## B. Régulation de la dissociation du complexe BubR1, Bub3 et CDC20

Nous avons montré que BubR1, Bub3 et Cdc20 peuvent être recrutées sur les cassures d'ADN jusqu'en début d'anaphase et que leur disparition des cassures avait lieu en télophase. Il reste à identifier les mécanismes permettant de préserver BubR1, Bub3 et Cdc20 sur les cassures de chromosomes en anaphase à un moment où ces protéines se dissocient des kinétochores (Bonnie J Howell et al. 2004).

Certaines données nous permettent de spéculer sur le mécanisme de dissociation de BubR1 des lésions d'ADN. Une étude a révélé que dans les cellules HeLa, BubR1 était acétylé en prométaphase par PCAF (Choi et al. 2009). De plus cette acétylation protège BubR1 de l'ubiquitination par l'APC/C<sup>CDC20</sup> et l'APC/C<sup>CDH1</sup>, et de la dégradation par le protéasome. BRCA2, un composant impliqué notamment dans la DDR (H. Lee 2014) se localise au kinétochore et participe au processus d'acétylation de BubR1 en favorisant son interaction avec PCAF (Choi et al. 2012). De plus, PLK1 est nécessaire à la localisation de BRCA2 au kinétochore et à l'acétylation de BubR1 (Park et al. 2017). L'ubiquitination et la dégradation de BubR1 nécessitent sa dé-acétylation. Le processus de dé-acétylation de BubR1 n'est pas encore clairement identifié. Une étude a montré que BubR1 est dé-acétylée par HDAC 2 et 3 (Histone dé-acétylase) et que l'interaction de HDAC 2 et 3 avec BubR1 nécessite également BRCA2 et PLK1 (Park et al. 2017). Ainsi, il est possible que ce mécanisme de dégradation de BubR1 par l'APC/C en anaphase soit conservé chez la drosophile et que BubR1 soit préservé spécifiquement sur les cassures d'ADN par un mécanisme d'acétylation impliquant PCAF, PLK1 et BRAC2. La dissociation de BubR1 des cassures en télophase pourrait être induite par sa dégradation due à sa dé-acétylation par HDAC 2 et 3, et/ou par le retrait de PCAF des cassures de chromosomes. Nous avons déjà montré que Polo est recrutée sur les cassures de chromosomes. Il serait donc intéressant maintenant d'examiner la dynamique de Gcn5 (Homologue de PCAF chez la Drosophile) et HDAC après laser ablation afin de déterminer si ces protéines sont recrutées sur les cassures de chromosomes. Il serait également intéressant d'étudier la dynamique de recrutement et de disparition des cassures de BubR1 en l'absence de PCAF ou HDAC. Il existe des lignées de Drosophile portant les mutations pour Gcn5 et HDAC3. Ces



expériences pourraient permettre de comprendre comment BubR1 est préservé sur les cassures de chromosomes.

## C. Régulation de la dissociation du complexe BubR1, Bub3 et CDC20 par la dégradation de CDC20

Chez l'humain, CDC20 est ubiquitinée en fin de mitose par l'APC/C<sup>CDH1</sup> et dégradée par le protéasome (Robbins and Cross 2010). Ce mécanisme semble conservé chez la levure (Shirayama et al. 1998; S. Prinz et al. 1998). Il est possible que la dissociation du complexe BubR1, Bub3 et CDC20 soit induite par l'APC/Ccdh1 dont l'activité croissante pourrait être suffisante pour ubiquitiner Cdc20 aux cassures et permettre sa dégradation par le protéasome. Ceci aurait pour conséquence de déstabiliser le complexe et de dissocier BubR1/Bub3 des lésions de chromosomes.

## IV. Fonctions de Polo, BubR1 et Bub3 sur les cassures

### A. Préserver la compaction de la chromatine au niveau des cassures

La présence de DSBs pendant la mitose peut induire la formation de fragments sans centromère appelés fragments acentriques. Ces fragments acentriques ne possèdent pas de kinétochores et ne peuvent donc pas s'attacher aux fibres kinétochoriennes du fuseau mitotique et être ségrégués durant l'anaphase. Nous avons montré que ces fragments acentriques migraient correctement vers les pôles lors de l'anaphase. Ce mécanisme nécessite le recrutement des protéines BubR1, Polo, Aurora B et INCENP sur une structure de chromatine (appelée "tether") faisant le lien entre les deux fragments du chromosome cassé. De plus, les fragments acentriques sont plus fréquemment dissociés de la partie centrique dans un contexte où les fonctions de Polo et BubR1 sont atténuées (Royou et al. 2010).

Des études chez l'homme ont révélées que les sous-unités CAP-H2 et CAP-D3 de la condensine II sont des substrats de PLK1. Les sous-unités Cap-H2 et CAP-D3 sont

phosphorylées par PLK1, menant à l'hyperphosphorylation de CAP-D3 (Abe et al. 2011)(Kagami, Ono, and Yoshida 2017). La phosphorylation des sous-unités de la condensine II par PLK1 a pour effet d'augmenter la condensation de la chromatine et de favoriser la ségrégation des chromosomes (J. H. Kim et al. 2014; (Abe et al. 2011).

Des études suggèrent que les condensines pourraient être impliquées dans la réparation de l'ADN. En effet, les cellules portant des mutations dans *cdn2* chez la levure (barren chez la *Drosophila*), *cap-h2* et *cap-g2* chez *Arabidopsis thaliana*, sont sensibles aux agents induisant des DSB (Aono et al. 2002; Sakamoto et al. 2011). Nos observations de la dynamique de deux sous-unités de la condensine I Barren (Cap-H) et Cap-G révèlent une accumulation spécifique de ces deux sous unités sur les cassures induites par laser ablation ou par I-CreI dans les neuroblastes de drosophiles (données non publiées). Polo pourrait réguler la compaction de l'ADN en phosphorylant les condensines, afin de favoriser la ségrégation des chromosomes cassés. En effet, nous avons observé dans le mutant *polo*, que le tether est plus long voire absent, et que les fragments acentriques migrent plus lentement vers les pôles (Royou et al. 2010). Ces défauts pourraient être dus à une absence de recrutement ou d'activation des condensines sur le tether.

## B. Favoriser la décaténation de la chromatine au niveau des cassures

Chez la *Drosophile* et la levure, les condensines collaborent avec la Topoisomérase II pour réguler la décaténation des chromatides soeurs, afin d'éviter la formation de ponts chromatiniens (Charbin, Bouchoux, and Uhlmann 2014; Piskadlo, Tavares, and Oliveira 2017; Coelho, Queiroz-Machado, and Sunkel 2003). Il a également été montré chez la levure que CDC5, l'homologue de Polo, phosphoryle les condensines ce qui favorise leur recrutement sur les bras de chromosomes en métaphase. Les condensines recrutent ensuite TopoII pour réguler la décaténation de l'ADN (Leonard et al. 2015).

Il est envisageable que Polo phosphoryle les condensines afin de réguler leur activité et leur recrutement au niveau des lésions à l'ADN. Les condensines, avec l'aide de TopoII, pourraient ensuite réguler la décaténation de l'ADN au niveau de la cassure et permettre la dissociation des deux fragments acentriques pendant l'anaphase.

## C. Protéger les condensines de la dégradation

Nous avons également montré que l'interaction de BubR1 avec Bub3 et Cdc20 était nécessaire à la ségrégation correcte des chromosomes acentriques, via la maintenance de l'intégrité du tether. De plus, le complexe BubR1/Bub3/Cdc20 inhibe localement l'APC/C autour de la cassure d'ADN, potentiellement pour éviter l'ubiquitination et la dégradation de certains substrats nécessaires à la ségrégation correcte des chromosomes endommagés. Ces substrats restent à être identifiés. Le complexe condensine II, plus précisément CAP-H2, pourrait être l'un de ces substrats pour les raisons évoquées dans les paragraphes précédents. De plus, il a été montré que la dégradation de CAP-H2 est induite *via* son ubiquitination par l'APC/C<sup>CDC20</sup> (Kagami, Ono, and Yoshida 2017). Il serait intéressant de suivre la dynamique de condensines tagguées par une protéine fluorescente pendant la mitose, et d'étudier l'impact d'une atténuation de la fonction de Polo, BubR1 ou Bub3 sur cette dynamique.

## V. Recrutement et rôle de Aurora B aux cassures

Nous avons montré que Aurora B est recrutée sur les cassures de chromosome en mitose et que ce recrutement est favorisé par Polo. Nous ne savons pas si Polo agit directement en phosphorylant Aurora B ou en favorisant le recrutement d'une protéine en amont de Aurora B.

Aurora B est recrutée sur la chromatine en mitose par les histones H2A et H3 phosphorylées. De plus, chez les vertébrés, PLK1 active la protéine Haspin, qui a pour rôle de phosphoryler l'histone H3 afin de promouvoir le recrutement de Aurora B sur la chromatine (Zhou et al. 2014; Ghenoïu, Wheelock, and Funabiki 2013). Il est donc possible que le recrutement de Aurora B passe par la phosphorylation de l'histone H3. Polo pourrait participer au recrutement de Aurora B en phosphorylant et en activant l'Haspine sur les cassures d'ADN pour promouvoir le recrutement de Aurora B.

Aurora B est impliquée dans de nombreuses fonctions en mitose, dont une fonction sur les chromosomes, qui est de favoriser la compaction de la chromatine par régulation des condensines (voir section "2. Les condensines" p10). Aurora B pourrait être recrutée sur les cassures d'ADN afin d'induire le recrutement des condensines et ainsi de

réguler la structure de la chromatine pour permettre la ségrégation correcte des chromosomes acentriques. A nouveau, les condensines semblent être des candidats intéressants à étudier.

## VI. Conclusion générale

Ces travaux nous ont permis d'avoir une meilleure compréhension du mécanisme permettant la ségrégation correcte de chromosomes cassés pendant la mitose. Nous avons identifié une voie de signalisation menant à l'inactivation de l'APC/C localement autour des cassures de chromosome.

Premièrement, les protéines de la DDR, ATM et le complexe MRN sont recrutées sur la cassure, et favorisent le recrutement de Polo. Polo à son tour, favorise le recrutement de BubR1 et Bub3, et Aurora B. Les protéines BubR1 et Bub3 interagissent avec CDC20 via le domaine KEN de BubR1 et induisent l'inhibition locale de l'APC/C, probablement dans le but de protéger un ou plusieurs substrats requis pour la ségrégation correcte des chromosomes cassés. L'un de ses substrats potentiels pourrait être les condensines.

Ces résultats montrent que les protéines de la DDR, les kinases mitotiques et les protéines du SAC ont une forte relation en mitose et participent ensemble à des mécanismes cellulaires complexes.

# **Références bibliographiques**



Abbas, T., U. Sivaprasad, K. Terai, V. Amador, M. Pagano, and A. Dutta. 2008. "PCNA-Dependent Regulation of P21 Ubiquitylation and Degradation via the CRL4Cdt2 Ubiquitin Ligase Complex." *Genes & Development* 22 (18):2496–2506. <https://doi.org/10.1101/gad.1676108>.

Abe, S., K. Nagasaka, Y. Hirayama, H. Kozuka-Hata, M. Oyama, Y. Aoyagi, C. Obuse, and T. Hirota. 2011. "The Initial Phase of Chromosome Condensation Requires Cdk1-Mediated Phosphorylation of the CAP-D3 Subunit of Condensin II." *Genes & Development* 25 (8):863–74. <https://doi.org/10.1101/gad.2016411>.

Abrahams, Brett S., and Daniel H. Geschwind. 2008. "Advances in Autism Genetics: On the Threshold of a New Neurobiology." *Nature Reviews Genetics* 9 (6):493–493. <https://doi.org/10.1038/nrg2380>.

Adams, Richard R., Alvaro AM Tavares, Adi Salzberg, Hugo J. Bellen, and David M. Glover. 1998. "Pavarotti Encodes a Kinesin-like Protein Required to Organize the Central Spindle and Contractile Ring for Cytokinesis." *Genes & Development* 12 (10):1483–1494.

Afonso, Olga, Irina Matos, António J. Pereira, Paulo Aguiar, Michael A. Lampson, and Helder Maiato. 2014. "Feedback Control of Chromosome Separation by a Midzone Aurora B Gradient." *Science (New York, N.Y.)* 345 (6194):332–36. <https://doi.org/10.1126/science.1251121>.

Agarwal, Ritu, and Orna Cohen-Fix. 2002. "Mitotic Regulation The Fine Tuning of Separase Activity." *Cell Cycle* 1 (4):253–55. <https://doi.org/10.4161/cc.1.4.133>.

Alushin, Gregory M, Vivek Musinipally, Daniel Matson, John Tooley, P Todd Stukenberg, and Eva Nogales. 2012. "Multimodal Microtubule Binding by the Ndc80 Kinetochore Complex." *Nature Structural & Molecular Biology* 19 (11):1161–67. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2411>.

Amano, Miho, Aussie Suzuki, Tetsuya Hori, Chelsea Backer, Katsuya Okawa, Iain M. Cheeseman, and Tatsuo Fukagawa. 2009. "The CENP-S Complex Is Essential for the Stable Assembly of Outer Kinetochore Structure." *The Journal of Cell Biology* 186 (2):173–82. <https://doi.org/10.1083/jcb.200903100>.

Amin, M. A., G. Itoh, K. Iemura, M. Ikeda, and K. Tanaka. 2014. "CLIP-170 Recruits PLK1 to Kinetochores during Early Mitosis for Chromosome Alignment." *Journal of Cell Science* 127 (13):2818–24. <https://doi.org/10.1242/jcs.150755>.

Andreassen, Paul R., Françoise B. Lacroix, Olivier D. Lohez, and Robert L. Margolis. 2001. "Neither P21WAF1 Nor 14-3-3 $\sigma$  Prevents G2 Progression to Mitotic Catastrophe in Human Colon Carcinoma Cells after DNA Damage, But P21WAF1 Induces Stable G1 Arrest in Resulting Tetraploid Cells." *Cancer Research* 61 (20):7660–68.

- Aono, Nobuki, Takashi Sutani, Takeshi Tomonaga, Satoru Mochida, and Mitsuhiro Yanagida. 2002. "Cnd2 Has Dual Roles in Mitotic Condensation and Interphase." *Nature* 417 (6885):417197a. <https://doi.org/10.1038/417197a>.
- Archambault, V., P. P. D'Avino, M. J. Deery, K. S. Lilley, and D. M. Glover. 2008. "Sequestration of Polo Kinase to Microtubules by Phosphoprimering-Independent Binding to Map205 Is Relieved by Phosphorylation at a CDK Site in Mitosis." *Genes & Development* 22 (19):2707–20. <https://doi.org/10.1101/gad.486808>.
- Archambault, V, G Lépine, and D Kachaner. 2015. "Understanding the Polo Kinase Machine." *Oncogene* 34 (37):4799–4807. <https://doi.org/10.1038/onc.2014.451>.
- Archambault, Vincent, and Mar Carmena. 2012. "Polo-like Kinase-Activating Kinases: Aurora A, Aurora B and What Else?" *Cell Cycle* 11 (8):1490–95. <https://doi.org/10.4161/cc.19724>.
- Archambault, Vincent, and David M. Glover. 2009. "Polo-like Kinases: Conservation and Divergence in Their Functions and Regulation." *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 10 (4):265–75. <https://doi.org/10.1038/nrm2653>.
- Axton, J. M., V. Dombrádi, P. T. Cohen, and D. M. Glover. 1990. "One of the Protein Phosphatase 1 Isoenzymes in Drosophila Is Essential for Mitosis." *Cell* 63 (1):33–46.
- Ayoub, Nabieh, Anand D. Jeyasekharan, Juan A. Bernal, and Ashok R. Venkitaraman. 2008. "HP1- $\beta$  Mobilization Promotes Chromatin Changes That Initiate the DNA Damage Response." *Nature* 453 (7195):682–86. <https://doi.org/10.1038/nature06875>.
- Bajer, A., and Jadwiga Molè-Bajer. 1955. "Cine-Micrographic Studies on Mitosis in Endosperm." *Chromosoma* 7 (1):558–607.
- Bartek, Jiri, and Jiri Lukas. 2003. "Chk1 and Chk2 Kinases in Checkpoint Control and Cancer." *Cancer Cell* 3 (5):421–29. [https://doi.org/10.1016/S1535-6108\(03\)00110-7](https://doi.org/10.1016/S1535-6108(03)00110-7).
- Bastians, H., L. M. Topper, G. L. Gorbsky, and J. V. Ruderman. 1999. "Cell Cycle-Regulated Proteolysis of Mitotic Target Proteins." *Molecular Biology of the Cell* 10 (11):3927–41.
- Basto, Renata, Frédéric Scaerou, Sarah Mische, Edward Wojcik, Christophe Lefebvre, Rui Gomes, Thomas Hays, and Roger Karess. 2004. "In Vivo Dynamics of the Rough Deal Checkpoint Protein during Drosophila Mitosis." *Current Biology: CB* 14 (1):56–61.
- Basu, J., E. Logarinho, S. Herrmann, H. Bousbaa, Z. Li, G. K. Chan, T. J. Yen, C. E. Sunkel, and M. L. Goldberg. 1998. "Localization of the Drosophila Checkpoint Control Protein Bub3 to the Kinetochore Requires Bub1 but Not Zw10 or Rod." *Chromosoma* 107 (6–7):376–85.
- Basu, Joydeep, Hassan Bousbaa, Elsa Logarinho, ZeXiao Li, Byron C. Williams, Carla Lopes, Claudio E. Sunkel, and Michael L. Goldberg. 1999. "Mutations in the Essential Spindle Checkpoint Gene Bub1 Cause Chromosome Missegregation and Fail to Block Apoptosis in Drosophila." *The Journal of Cell Biology* 146 (1):13–28.



- Benada, Jan, Kamila Burdová, Tomáš Lidak, Patrick von Morgen, and Libor Macurek. 2015. "Polo-like Kinase 1 Inhibits DNA Damage Response during Mitosis." *Cell Cycle* 14 (2):219–31. <https://doi.org/10.4161/15384101.2014.977067>.
- Berkovich, Elijah, Raymond J. Monnat, and Michael B. Kastan. 2007. "Roles of ATM and NBS1 in Chromatin Structure Modulation and DNA Double-Strand Break Repair." *Nature Cell Biology* 9 (6):683–90. <https://doi.org/10.1038/ncb1599>.
- Birkenfeld, Jörg, Perihan Nalbant, Benjamin P. Bohl, Olivier Pertz, Klaus M. Hahn, and Gary M. Bokoch. 2007. "GEF-H1 Modulates Localized RhoA Activation during Cytokinesis under the Control of Mitotic Kinases." *Developmental Cell* 12 (5):699–712. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2007.03.014>.
- Bolanos-Garcia, Victor M., and Tom L. Blundell. 2011. "BUB1 and BUBR1: Multifaceted Kinases of the Cell Cycle." *Trends in Biochemical Sciences* 36 (3):141–50. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2010.08.004>.
- Bolanos-Garcia, V.M., S. Beauflis, A. Renault, J.G. Grossmann, S. Brewerton, M. Lee, A. Venkitaraman, and T.L. Blundell. 2005. "The Conserved N-Terminal Region of the Mitotic Checkpoint Protein BUBR1: A Putative TPR Motif of High Surface Activity." *Biophysical Journal* 89 (4):2640–49. <https://doi.org/10.1529/biophysj.105.063511>.
- Börner, Kenneth, and Peter B. Becker. 2016. "Splice Variants of the SWR1-Type Nucleosome Remodeling Factor Domino Have Distinct Functions during *Drosophila Melanogaster* Oogenesis." *Development* 143 (17):3154–67. <https://doi.org/10.1242/dev.139634>.
- Boyarchuk, Yekaterina, Adrian Salic, Mary Dasso, and Alexei Arnaoutov. 2007. "Bub1 Is Essential for Assembly of the Functional Inner Centromere." *The Journal of Cell Biology* 176 (7):919–28. <https://doi.org/10.1083/jcb.200609044>.
- Brandsma, Inger, and Dik C. Gent. 2012. "Pathway Choice in DNA Double Strand Break Repair: Observations of a Balancing Act." *Genome Integrity* 3 (1):9. <https://doi.org/10.1186/2041-9414-3-9>.
- Brinkley, B. R., and E. Stubblefield. 1966. "The Fine Structure of the Kinetochore of a Mammalian Cell in Vitro." *Chromosoma* 19 (1):28–43.
- Bruinsma, Wytse, Jonne A. Raaijmakers, and René H. Medema. 2012. "Switching Polo-like Kinase-1 on and off in Time and Space." *Trends in Biochemical Sciences* 37 (12):534–42. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2012.09.005>.
- Buffin, Eulalie, Doruk Emre, and Roger E. Karess. 2007. "Flies without a Spindle Checkpoint." *Nature Cell Biology* 9 (5):565–72. <https://doi.org/10.1038/ncb1570>.
- Bunz, F., A. Dutriaux, C. Lengauer, T. Waldman, S. Zhou, J. P. Brown, J. M. Sedivy, K. W. Kinzler, and B. Vogelstein. 1998. "Requirement for P53 and P21 to Sustain G2 Arrest after DNA Damage." *Science (New York, N.Y.)* 282 (5393):1497–1501.

Burgess, Rebecca C., Bharat Burman, Michael J. Kruhlak, and Tom Misteli. 2014. "Activation of DNA Damage Response Signaling by Condensed Chromatin." *Cell Reports* 9 (5):1703–17. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.10.060>.

Burkard, Mark E., John Maciejowski, Verónica Rodríguez-Bravo, Michael Repka, Drew M. Lowery, Karl R. Clauser, Chao Zhang, et al. 2009. "Plk1 Self-Organization and Priming Phosphorylation of HsCYK-4 at the Spindle Midzone Regulate the Onset of Division in Human Cells." Edited by David Pellman. *PLoS Biology* 7 (5):e1000111. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1000111>.

Burma, S., B. P. Chen, M. Murphy, A. Kurimasa, and D. J. Chen. 2001. "ATM Phosphorylates Histone H2AX in Response to DNA Double-Strand Breaks." *The Journal of Biological Chemistry* 276 (45):42462–67. <https://doi.org/10.1074/jbc.C100466200>.

Burton, J. L., and M. J. Solomon. 2007. "Mad3p, a Pseudosubstrate Inhibitor of APCCdc20 in the Spindle Assembly Checkpoint." *Genes & Development* 21 (6):655–67. <https://doi.org/10.1101/gad.1511107>.

Burton, Janet L., and Mark J. Solomon. 2001. "D Box and KEN Box Motifs in Budding Yeast Hsl1p Are Required for APC-Mediated Degradation and Direct Binding to Cdc20p and Cdh1p." *Genes & Development* 15 (18):2381–2395.

Butler, Laura R., Ruth M. Densham, Junying Jia, Alexander J. Garvin, Helen R. Stone, Vandna Shah, Daniel Weekes, Frederic Festy, James Beesley, and Joanna R. Morris. 2012. "The Proteasomal De-Ubiquitinating Enzyme POH1 Promotes the Double-Strand DNA Break Response." *The EMBO Journal* 31 (19):3918–3934.

Cai, Zhenjian, Nabil H. Chehab, and Nikola P. Pavletich. 2009. "Structure and Activation Mechanism of the CHK2 DNA Damage Checkpoint Kinase." *Molecular Cell* 35 (6):818–29. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2009.09.007>.

Capalbo, L., E. Montembault, T. Takeda, Z. I. Bassi, D. M. Glover, and P. P. D'Avino. 2012. "The Chromosomal Passenger Complex Controls the Function of Endosomal Sorting Complex Required for Transport-III Snf7 Proteins during Cytokinesis." *Open Biology* 2 (5):120070–120070. <https://doi.org/10.1098/rsob.120070>.

Carmena, Mar, Xavier Pinson, Melpi Platani, Zeina Salloum, Zhenjie Xu, Anthony Clark, Fiona MacIsaac, et al. 2012a. "The Chromosomal Passenger Complex Activates Polo Kinase at Centromeres." Edited by R. Scott Hawley. *PLoS Biology* 10 (1):e1001250. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001250>.

"Cell Cycle Regulation of the Activity and Subcellular Localization of Plk1, a Human Protein Kinase Implicated in Mitotic Spindle Function." 1995. *The Journal of Cell Biology* 129 (6):1617–28.

Cesario, J. M., J. K. Jang, B. Redding, N. Shah, T. Rahman, and K. S. McKim. 2006. "Kinesin 6 Family Member Subito Participates in Mitotic Spindle Assembly and Interacts with Mitotic Regulators." *Journal of Cell Science* 119 (22):4770–80. <https://doi.org/10.1242/jcs.03235>.

Chan, CSM., and D. Botstein. 1993. "Isolation and Characterization of Chromosome-Gain and Increase-in-Ploidy Mutants in Yeast." *Genetics* 135 (3):677–91.

Chan, Ying Wai, A. Arockia Jeyaprakash, Erich A. Nigg, and Anna Santamaria. 2012. "Aurora B Controls Kinetochore–microtubule Attachments by Inhibiting Ska Complex–KMN Network Interaction." *The Journal of Cell Biology* 196 (5):563–71. <https://doi.org/10.1083/jcb.201109001>.

Chang, Leifu, Ziguang Zhang, Jing Yang, Stephen H. McLaughlin, and David Barford. 2014. "Molecular Architecture and Mechanism of the Anaphase-Promoting Complex." *Nature* 513 (7518):388–93. <https://doi.org/10.1038/nature13543>.

Chapman, J. Ross, Patricia Barral, Jean-Baptiste Vannier, Valérie Borel, Martin Steger, Antonia Tomas-Loba, Alessandro A. Sartori, Ian R. Adams, Facundo D. Batista, and Simon J. Boulton. 2013. "RIF1 Is Essential for 53BP1-Dependent Nonhomologous End Joining and Suppression of DNA Double-Strand Break Resection." *Molecular Cell* 49 (5):858–71. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2013.01.002>.

Charbin, Adrian, Céline Bouchoux, and Frank Uhlmann. 2014. "Condensin Aids Sister Chromatid Decatenation by Topoisomerase II." *Nucleic Acids Research* 42 (1):340–48. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt882>.

Cheeseman, Iain M., Joshua S. Chappie, Elizabeth M. Wilson-Kubalek, and Arshad Desai. 2006. "The Conserved KMN Network Constitutes the Core Microtubule-Binding Site of the Kinetochore." *Cell* 127 (5):983–97. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.09.039>.

Cheeseman, Iain M., and Arshad Desai. 2008. "Molecular Architecture of the Kinetochore–microtubule Interface." *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 9 (1):33–46. <https://doi.org/10.1038/nrm2310>.

Cheeseman, Iain M., Tetsuya Hori, Tatsuo Fukagawa, and Arshad Desai. 2008. "KNL1 and the CENP-H/I/K Complex Coordinately Direct Kinetochore Assembly in Vertebrates." *Molecular Biology of the Cell* 19 (2):587–94. <https://doi.org/10.1091/mbc.E07-10-1051>.

Cheeseman, Iain M., Sherry Niessen, Scott Anderson, Francie Hyndman, John R. Yates, Karen Oegema, and Arshad Desai. 2004. "A Conserved Protein Network Controls Assembly of the Outer Kinetochore and Its Ability to Sustain Tension." *Genes & Development* 18 (18):2255–68. <https://doi.org/10.1101/gad.1234104>.

Cheng, Kin-Yip, Edward D. Lowe, John Sinclair, Erich A. Nigg, and Louise N. Johnson. 2003. "The Crystal Structure of the Human Polo-like Kinase-1 Polo Box Domain and Its Phospho-Peptide Complex." *The EMBO Journal* 22 (21):5757–68. <https://doi.org/10.1093/emboj/cdg558>.

Choi, Eunhee, Hyerim Choe, Jaewon Min, Ji Yoon Choi, Jimi Kim, and Hyunsook Lee. 2009. "BubR1 Acetylation at Prometaphase Is Required for Modulating APC/C Activity and Timing of Mitosis." *The EMBO Journal* 28 (14):2077–2089.

Choi, Eunhee, Pil-Gu Park, Hae-ock Lee, Yoo-Kyung Lee, Gyeong Hoon Kang, Jong Won Lee, Wonshik Han, et al. 2012. "BRCA2 Fine-Tunes the Spindle Assembly Checkpoint through Reinforcement of BubR1 Acetylation." *Developmental Cell* 22 (2):295–308. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2012.01.009>.

Chu, Youjun, Phil Y. Yao, Wenwen Wang, Dongmei Wang, Zhikai Wang, Liangyu Zhang, Yuejia Huang, Yuwen Ke, Xia Ding, and Xuebiao Yao. 2011. "Aurora B Kinase Activation Requires Survivin Priming Phosphorylation by PLK1." *Journal of Molecular Cell Biology* 3 (4):260–67. <https://doi.org/10.1093/jmcb/mjq037>.

Ciccia, Alberto, and Stephen J. Elledge. 2010. "The DNA Damage Response: Making It Safe to Play with Knives." *Molecular Cell* 40 (2):179–204. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2010.09.019>.

Ciosk, Rafal, Masaki Shirayama, Anna Shevchenko, Tomoyuki Tanaka, Attila Toth, Andrej Shevchenko, and Kim Nasmyth. 2000. "Cohesin's Binding to Chromosomes Depends on a Separate Complex Consisting of Scc2 and Scc4 Proteins." *Molecular Cell* 5 (2):243–254.

Clute, P., and J. Pines. 1999. "Temporal and Spatial Control of Cyclin B1 Destruction in Metaphase." *Nature Cell Biology* 1 (2):82–87. <https://doi.org/10.1038/10049>.

Cobbe, Neville, and Margarete M. S. Heck. 2000. "Review: SMCs in the World of Chromosome Biology— From Prokaryotes to Higher Eukaryotes." *Journal of Structural Biology* 129 (2):123–43. <https://doi.org/10.1006/jsbi.2000.4255>.

Coelho, Paula A., Joana Queiroz-Machado, and Claudio E. Sunkel. 2003. "Condensin-Dependent Localisation of Topoisomerase II to an Axial Chromosomal Structure Is Required for Sister Chromatid Resolution during Mitosis." *Journal of Cell Science* 116 (Pt 23):4763–76. <https://doi.org/10.1242/jcs.00799>.

Collin, Philippe, Oxana Nashchekina, Rachael Walker, and Jonathon Pines. 2013. "The Spindle Assembly Checkpoint Works like a Rheostat Rather than a Toggle Switch." *Nature Cell Biology* 15 (11):1378–85. <https://doi.org/10.1038/ncb2855>.

D'Arcy, Sheena, Owen R. Davies, Tom L. Blundell, and Victor M. Bolanos-Garcia. 2010. "Defining the Molecular Basis of BubR1 Kinetochore Interactions and APC/C-CDC20 Inhibition." *Journal of Biological Chemistry* 285 (19):14764–76. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.082016>.

De Antoni, Anna, Chad G. Pearson, Daniela Cimini, Julie C. Canman, Valeria Sala, Luigi Nezi, Marina Mapelli, et al. 2005. "The Mad1/Mad2 Complex as a Template for Mad2 Activation in the Spindle Assembly Checkpoint." *Current Biology* 15 (3):214–25. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2005.01.038>.

DeLuca, Jennifer G., Walter E. Gall, Claudio Ciferri, Daniela Cimini, Andrea Musacchio, and E.D. Salmon. 2006. "Kinetochore Microtubule Dynamics and Attachment Stability Are Regulated by Hec1." *Cell* 127 (5):969–82. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.09.047>.

Derive, N., C. Landmann, E. Montembault, M.-C. Claverie, P. Pierre-Elies, D. Goutte-Gattat, N. Founounou, D. McCusker, and A. Royou. 2015. "Bub3-BubR1-Dependent Sequestration of Cdc20Fizzy at DNA Breaks Facilitates the Correct Segregation of Broken Chromosomes." *The Journal of Cell Biology* 211 (3):517–32. <https://doi.org/10.1083/jcb.201504059>.

Descombes, P, and E A Nigg. 1998. "The Polo-like Kinase Plx1 Is Required for M Phase Exit and Destruction of Mitotic Regulators in *Xenopus* Egg Extracts." *The EMBO Journal* 17 (5):1328–35. <https://doi.org/10.1093/emboj/17.5.1328>.

Di Fiore, Barbara, Claudia Wurzenberger, Norman E. Davey, and Jonathon Pines. 2016. "The Mitotic Checkpoint Complex Requires an Evolutionary Conserved Cassette to Bind and Inhibit Active APC/C." *Molecular Cell* 64 (6):1144–53. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2016.11.006>.

Diaz-Martinez, Laura A., Wei Tian, Bing Li, Ross Warrington, Luying Jia, Chad A. Brautigam, Xuelian Luo, and Hongtao Yu. 2015. "The Cdc20-Binding Phe Box of the Spindle Checkpoint Protein BubR1 Maintains the Mitotic Checkpoint Complex During Mitosis." *Journal of Biological Chemistry* 290 (4):2431–43. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.616490>.

Dick, Amalie E., and Daniel W. Gerlich. 2013. "Kinetic Framework of Spindle Assembly Checkpoint Signalling." *Nature Cell Biology* 15 (11):1370–77. <https://doi.org/10.1038/ncb2842>.

Di Fiore, Barbara, Norman E. Davey, Anja Hagting, Daisuke Izawa, Jörg Mansfeld, Toby J. Gibson, and Jonathon Pines. 2015. "The ABBA Motif Binds APC/C Activators and Is Shared by APC/C Substrates and Regulators." *Developmental Cell* 32 (3):358–72. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2015.01.003>.

Dobrynin, G., O. Popp, T. Romer, S. Bremer, M. H. A. Schmitz, D. W. Gerlich, and H. Meyer. 2011. "Cdc48/P97-Ufd1-Npl4 Antagonizes Aurora B during Chromosome Segregation in HeLa Cells." *Journal of Cell Science* 124 (9):1571–80. <https://doi.org/10.1242/jcs.069500>.

Dorsett, Dale. 2009. "Cohesin, Gene Expression and Development: Lessons from *Drosophila*." *Chromosome Research: An International Journal on the Molecular, Supramolecular and Evolutionary Aspects of Chromosome Biology* 17 (2):185–200. <https://doi.org/10.1007/s10577-009-9022-5>.

Douglas, Max E., Tim Davies, Nimesh Joseph, and Masanori Mishima. 2010. "Aurora B and 14-3-3 Coordinately Regulate Clustering of Centralspindlin during Cytokinesis." *Current Biology* 20 (10):927–33. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2010.03.055>.

Drinnenberg, Ines A., Steven Henikoff, and Harmit S. Malik. 2016. "Evolutionary Turnover of Kinetochore Proteins: A Ship of Theseus?" *Trends in Cell Biology* 26 (7):498–510. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2016.01.005>.

Dumont, Julien, and Arshad Desai. 2012. "Acentrosomal Spindle Assembly & Chromosome Segregation During Oocyte Meiosis." *Trends in Cell Biology* 22 (5):241–49. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2012.02.007>.

Duranteau, Marie, Jean-Jacques Montagne, and Zohra Rahmani. 2016. "A Novel Mutation in the N-Terminal Domain of *Drosophila* BubR1 Affects the Spindle Assembly Checkpoint Function of BubR1." *Biology Open* 5 (11):1674–79. <https://doi.org/10.1242/bio.021196>.

Earnshaw, W. C., and N. Rothfield. 1985. "Identification of a Family of Human Centromere Proteins Using Autoimmune Sera from Patients with Scleroderma." *Chromosoma* 91 (3–4):313–21.

Edenberg, Ellen R., Ajay Vashisht, Jennifer A. Benanti, James Wohlschlegel, and David P. Toczyski. 2014. "Rad53 Downregulates Mitotic Gene Transcription by Inhibiting the Transcriptional Activator Ndd1." *Molecular and Cellular Biology* 34 (4):725–38. <https://doi.org/10.1128/MCB.01056-13>.

Edgar, B. A., and P. H. O'Farrell. 1989. "Genetic Control of Cell Division Patterns in the *Drosophila* Embryo." *Cell* 57 (1):177–87.

Elia, Andrew E.H., Peter Rellos, Lesley F. Haire, Jerry W. Chao, Frank J. Ivins, Katja Hoepker, Duaa Mohammad, Lewis C. Cantley, Stephen J. Smerdon, and Michael B. Yaffe. 2003. "The Molecular Basis for Phosphodependent Substrate Targeting and Regulation of Plks by the Polo-Box Domain." *Cell* 115 (1):83–95. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(03\)00725-6](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(03)00725-6).

Elledge, Stephen J. 1996. "Cell Cycle Checkpoints: Preventing an Identity Crisis." *Science* 274 (5293):1664.

Elowe, S., S. Hummer, A. Uldschmid, X. Li, and E. A. Nigg. 2007. "Tension-Sensitive Plk1 Phosphorylation on BubR1 Regulates the Stability of Kinetochores Microtubule Interactions." *Genes & Development* 21 (17):2205–19. <https://doi.org/10.1101/gad.436007>.

Espert, Antonio, Pelin Uluocak, Ricardo Nunes Bastos, Davinderpreet Mangat, Philipp Graab, and Ulrike Gruneberg. 2014. "PP2A-B56 Opposes Mps1 Phosphorylation of Knl1 and Thereby Promotes Spindle Assembly Checkpoint Silencing." *The Journal of Cell Biology* 206 (7):833–42. <https://doi.org/10.1083/jcb.201406109>.

Fabbro, Megan, Bin-Bing Zhou, Mikiko Takahashi, Boris Sarcevic, Preeti Lal, Mark E. Graham, Brian G. Gabrielli, et al. 2005. "Cdk1/Erk2- and Plk1-Dependent Phosphorylation of a Centrosome Protein, Cep55, Is Required for Its Recruitment to Midbody and Cytokinesis." *Developmental Cell* 9 (4):477–88. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2005.09.003>.

Faesen, Alex C., Maria Thanasoula, Stefano Maffini, Claudia Breit, Franziska Müller, Suzan van Gerwen, Tanja Bange, and Andrea Musacchio. 2017. "Basis of Catalytic Assembly of the Mitotic Checkpoint Complex." *Nature* 542 (7642):498–502. <https://doi.org/10.1038/nature21384>.

- Falck, J., N. Mailand, R. G. Syljuåsen, J. Bartek, and J. Lukas. 2001. "The ATM-Chk2-Cdc25A Checkpoint Pathway Guards against Radioresistant DNA Synthesis." *Nature* 410 (6830):842–47. <https://doi.org/10.1038/35071124>.
- Fang, Guowei. 2002. "Checkpoint Protein BubR1 Acts Synergistically with Mad2 to Inhibit Anaphase-Promoting Complex." *Molecular Biology of the Cell* 13 (3):755–766.
- Fantes, P. 1979. "Epistatic Gene Interactions in the Control of Division in Fission Yeast." *Nature* 279 (5712):428–30. <https://doi.org/10.1038/279428a0>.
- Feng, Lin, and Junjie Chen. 2012. "The E3 Ligase RNF8 Regulates KU80 Removal and NHEJ Repair." *Nature Structural & Molecular Biology* 19 (2):201–6. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2211>.
- Feringa, Femke M., Lenno Krenning, André Koch, Jeroen van den Berg, Bram van den Broek, Kees Jalink, and René H. Medema. 2016. "Hypersensitivity to DNA Damage in Antephase as a Safeguard for Genome Stability." *Nature Communications* 7 (August):12618. <https://doi.org/10.1038/ncomms12618>.
- Ferrigno, P., T. A. Langan, and P. Cohen. 1993. "Protein Phosphatase 2A1 Is the Major Enzyme in Vertebrate Cell Extracts That Dephosphorylates Several Physiological Substrates for Cyclin-Dependent Protein Kinases." *Molecular Biology of the Cell* 4 (7):669–77.
- Floyd, Suzanne, Jonathon Pines, and Catherine Lindon. 2008. "APC/CCdh1 Targets Aurora Kinase to Control Reorganization of the Mitotic Spindle at Anaphase." *Current Biology* 18 (21):1649–58. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2008.09.058>.
- Foley, Emily A., and Tarun M. Kapoor. 2012. "Microtubule Attachment and Spindle Assembly Checkpoint Signalling at the Kinetochores." *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 14 (1):25–37. <https://doi.org/10.1038/nrm3494>.
- Foley, Emily A., Maria Maldonado, and Tarun M. Kapoor. 2011. "Formation of Stable Attachments between Kinetochores and Microtubules Depends on the B56-PP2A Phosphatase." *Nature Cell Biology* 13 (10):1265–71. <https://doi.org/10.1038/ncb2327>.
- Foltz, Daniel R., Lars E. T. Jansen, Ben E. Black, Aaron O. Bailey, John R. Yates, and Don W. Cleveland. 2006. "The Human CENP-A Centromeric Nucleosome-Associated Complex." *Nature Cell Biology* 8 (5):458–69. <https://doi.org/10.1038/ncb1397>.
- Fourest-lieuvin, Anne, Leticia Peris, Vincent Gache, Isabel Garcia-saez, Céline Juillanbinard, and Violaine Lantéz. 2005. *Microtubule Regulation in Mitosis: Tubulin Phosphorylation by the Cyclin-Dependent Kinase Cdk1* □D.
- Francisco, Leigh, Wenfang Wang, and C. S. Chan. 1994. "Type 1 Protein Phosphatase Acts in Opposition to Ipl1 Protein Kinase in Regulating Yeast Chromosome Segregation." *Molecular and Cellular Biology* 14 (7):4731–4740.

Gaitanos, Thomas N., Anna Santamaria, A. Arockia Jeyaprakash, Bin Wang, Elena Conti, and Erich A. Nigg. 2009. "Stable Kinetochore-Microtubule Interactions Depend on the Ska Complex and Its New Component Ska3/C13Orf3." *The EMBO Journal* 28 (10):1442–52. <https://doi.org/10.1038/emboj.2009.96>.

Galanty, Yaron, Rimma Belotserkovskaya, Julia Coates, and Stephen P. Jackson. 2012. "RNF4, a SUMO-Targeted Ubiquitin E3 Ligase, Promotes DNA Double-Strand Break Repair." *Genes & Development* 26 (11):1179–95. <https://doi.org/10.1101/gad.188284.112>.

Galgoczy, D. J., and D. P. Toczyski. 2001. "Checkpoint Adaptation Precedes Spontaneous and Damage-Induced Genomic Instability in Yeast." *Molecular and Cellular Biology* 21 (5):1710–18. <https://doi.org/10.1128/MCB.21.5.1710-1718.2001>.

Gao, Shan, Maria Grazia Giansanti, Graham J. Buttrick, Sharada Ramasubramanyan, Adam Auton, Maurizio Gatti, and James G. Wakefield. 2008. "Australin: A Chromosomal Passenger Protein Required Specifically for *Drosophila Melanogaster* Male Meiosis." *The Journal of Cell Biology* 180 (3):521–35. <https://doi.org/10.1083/jcb.200708072>.

Gassmann, R., A. J. Holland, D. Varma, X. Wan, F. Civril, D. W. Cleveland, K. Oegema, E. D. Salmon, and A. Desai. 2010. "Removal of Spindly from Microtubule-Attached Kinetochores Controls Spindle Checkpoint Silencing in Human Cells." *Genes & Development* 24 (9):957–71. <https://doi.org/10.1101/gad.1886810>.

Gheghiani, Lilia, Damarys Loew, Bérangère Lombard, Jörg Mansfeld, and Olivier Gavet. 2017. "PLK1 Activation in Late G2 Sets Up Commitment to Mitosis." *Cell Reports* 19 (10):2060–73. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.05.031>.

Ghenoiu, Cristina, Michael S. Wheelock, and Hironori Funabiki. 2013. "Autoinhibition and Polo-Dependent Multisite Phosphorylation Restrict Activity of the Histone H3 Kinase Haspin to Mitosis." *Molecular Cell* 52 (5). <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2013.10.002>.

Giet, Régis, and David M. Glover. 2001. "Drosophila Aurora B Kinase Is Required for Histone H3 Phosphorylation and Condensin Recruitment during Chromosome Condensation and to Organize the Central Spindle during Cytokinesis." *The Journal of Cell Biology* 152 (4):669–682.

Giunta, S., R. Belotserkovskaya, and S. P. Jackson. 2010. "DNA Damage Signaling in Response to Double-Strand Breaks during Mitosis." *The Journal of Cell Biology* 190 (2):197–207. <https://doi.org/10.1083/jcb.200911156>.

Glotzer, M., A. W. Murray, and M. W. Kirschner. 1991. "Cyclin Is Degraded by the Ubiquitin Pathway." *Nature* 349 (6305):132–38. <https://doi.org/10.1038/349132a0>.

Glover, David M., Mark H. Leibowitz, Doris A. McLean, and Huw Parry. 1995. "Mutations in Aurora Prevent Centrosome Separation Leading to the Formation of Monopolar Spindles." *Cell* 81 (1):95–105.



Golan, Amnon, Yana Yudkovsky, and Avram Hershko. 2002. "The Cyclin-Ubiquitin Ligase Activity of Cyclosome/APC Is Jointly Activated by Protein Kinases Cdk1-Cyclin B and Plk." *Journal of Biological Chemistry* 277 (18):15552–57. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111476200>.

Goto, Hidemasa, Tohru Kiyono, Yasuko Tomono, Aie Kawajiri, Takeshi Urano, Koichi Furukawa, Erich A. Nigg, and Masaki Inagaki. 2006. "Complex Formation of Plk1 and INCENP Required for Metaphase–anaphase Transition." *Nature Cell Biology* 8 (2):180–87. <https://doi.org/10.1038/ncb1350>.

Green, L. C., P. Kalitsis, T. M. Chang, M. Cipetic, J. H. Kim, O. Marshall, L. Turnbull, et al. 2012. "Contrasting Roles of Condensin I and Condensin II in Mitotic Chromosome Formation." *Journal of Cell Science* 125 (6):1591–1604. <https://doi.org/10.1242/jcs.097790>.

Gruneberg, Ulrike, Rüdiger Neef, Reiko Honda, Erich A. Nigg, and Francis A. Barr. 2004. "Relocation of Aurora B from Centromeres to the Central Spindle at the Metaphase to Anaphase Transition Requires MKlp2." *The Journal of Cell Biology* 166 (2):167–72. <https://doi.org/10.1083/jcb.200403084>.

Guo, Yige, Christine Kim, Sana Ahmad, Jiayin Zhang, and Yinghui Mao. 2012. "CENP-E-dependent BubR1 Autophosphorylation Enhances Chromosome Alignment and the Mitotic Checkpoint." *The Journal of Cell Biology* 198 (2):205–17. <https://doi.org/10.1083/jcb.201202152>.

Haase, Julian, Prashant K. Mishra, Andrew Stephens, Rachel Haggerty, Cory Quammen, Russell M. Taylor, Elaine Yeh, Munira A. Basrai, and Kerry Bloom. 2013. "A 3D Map of the Yeast Kinetochore Reveals the Presence of Core and Accessory Centromere Specific Histone." *Current Biology: CB* 23 (19):1939–44. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2013.07.083>.

Han, Joo Seok, Andrew J. Holland, Daniele Fachinetti, Anita Kulukian, Bulent Cetin, and Don W. Cleveland. 2013. "Catalytic Assembly of the Mitotic Checkpoint Inhibitor BubR1-Cdc20 by a Mad2-Induced Functional Switch in Cdc20." *Molecular Cell* 51 (1):92–104. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2013.05.019>.

Hanisch, Anja, Herman H. W. Silljé, and Erich A. Nigg. 2006. "Timely Anaphase Onset Requires a Novel Spindle and Kinetochore Complex Comprising Ska1 and Ska2." *The EMBO Journal* 25 (23):5504–15. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601426>.

Hansen, David V., Alexander V. Loktev, Kenneth H. Ban, and Peter K. Jackson. 2004. "Plk1 Regulates Activation of the Anaphase Promoting Complex by Phosphorylating and Triggering SCF $\beta$ TrCP-Dependent Destruction of the APC Inhibitor Emi1." *Molecular Biology of the Cell* 15 (12):5623–5634.

Hara, T., M. Abe, H. Inoue, L. R. Yu, T. D. Veenstra, Y. H. Kang, K. S. Lee, and T. Miki. 2006. "Cytokinesis Regulator ECT2 Changes Its Conformation through Phosphorylation at Thr-341 in G2/M Phase." *Oncogene* 25 (4):566–578.

Hardwick, Kevin G., Raymond C. Johnston, Dana L. Smith, and Andrew W. Murray. 2000. "MAD3 Encodes a Novel Component of the Spindle Checkpoint Which Interacts with Bub3p, Cdc20p, and Mad2p." *The Journal of Cell Biology* 148 (5):871–82.

Harper, J. Wade, Stephen J. Elledge, Khandan Keyomarsi, Brian Dynlacht, Li-Huei Tsai, Pumin Zhang, Steven Dobrowolski, Connell Bai, Lisa Connell-Crowley, and Eric Swindell. 1995. "Inhibition of Cyclin-Dependent Kinases by P21." *Molecular Biology of the Cell* 6 (4):387–400.

Hauf, Silke, Richard W. Cole, Sabrina LaTerra, Christine Zimmer, Gisela Schnapp, Rainer Walter, Armin Heckel, Jacques van Meel, Conly L. Rieder, and Jan-Michael Peters. 2003. "The Small Molecule Hesperadin Reveals a Role for Aurora B in Correcting Kinetochore–microtubule Attachment and in Maintaining the Spindle Assembly Checkpoint." *The Journal of Cell Biology* 161 (2):281–94. <https://doi.org/10.1083/jcb.200208092>.

Hauf, Silke, Elisabeth Roitinger, Birgit Koch, Christina M Dittrich, Karl Mechtler, and Jan-Michael Peters. 2005. "Dissociation of Cohesin from Chromosome Arms and Loss of Arm Cohesion during Early Mitosis Depends on Phosphorylation of SA2." Edited by R. Scott Hawley. *PLoS Biology* 3 (3):e69. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0030069>.

Heald, R., R. Tournebise, T. Blank, R. Sandaltzopoulos, P. Becker, A. Hyman, and E. Karsenti. 1996. "Self-Organization of Microtubules into Bipolar Spindles around Artificial Chromosomes in *Xenopus* Egg Extracts." *Nature* 382 (6590):420–25. <https://doi.org/10.1038/382420a0>.

Heinrich, Stephanie, Eva-Maria Geissen, Julia Kamenz, Susanne Trautmann, Christian Widmer, Philipp Drewe, Michael Knop, Nicole Radde, Jan Hasenauer, and Silke Hauf. 2013. "Determinants of Robustness in Spindle Assembly Checkpoint Signalling." *Nature Cell Biology* 15 (11):1328–39. <https://doi.org/10.1038/ncb2864>.

Henikoff, Steven, Kami Ahmad, J. Suso Platero, and Bas van Steensel. 2000. "Heterochromatic Deposition of Centromeric Histone H3-like Proteins." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97 (2):716–721.

Herzog, Sabine, Sonal Nagarkar Jaiswal, Evelin Urban, Anna Riemer, Sina Fischer, and Stefan K. Heidmann. 2013. "Functional Dissection of the *Drosophila Melanogaster* Condensin Subunit Cap-G Reveals Its Exclusive Association with Condensin I." Edited by R. Scott Hawley. *PLoS Genetics* 9 (4):e1003463. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003463>.

Hoffman, David B., Chad G. Pearson, Tim J. Yen, Bonnie J. Howell, and E. D. Salmon. 2001. "Microtubule-Dependent Changes in Assembly of Microtubule Motor Proteins and Mitotic Spindle Checkpoint Proteins at PtK1 Kinetochores." *Molecular Biology of the Cell* 12 (7):1995–2009.

Honda, Reiko, Roman Körner, and Erich A. Nigg. 2003. "Exploring the Functional Interactions between Aurora B, INCENP, and Survivin in Mitosis." *Molecular Biology of the Cell* 14 (8):3325–3341.

Hori, Tetsuya, Miho Amano, Aussie Suzuki, Chelsea B. Backer, Julie P. Welburn, Yimin Dong, Bruce F. McEwen, et al. 2008. "CCAN Makes Multiple Contacts with Centromeric DNA to Provide Distinct Pathways to the Outer Kinetochore." *Cell* 135 (6):1039–52. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.10.019>.

Howell, B. J., B. F. McEwen, J. C. Canman, D. B. Hoffman, E. M. Farrar, C. L. Rieder, and E. D. Salmon. 2001. "Cytoplasmic Dynein/Dynactin Drives Kinetochore Protein Transport to the Spindle Poles and Has a Role in Mitotic Spindle Checkpoint Inactivation." *The Journal of Cell Biology* 155 (7):1159–72. <https://doi.org/10.1083/jcb.200105093>.

Howell, Bonnie J, Ben Moree, Emily M Farrar, Scott Stewart, Guowei Fang, and E. D Salmon. 2004. "Spindle Checkpoint Protein Dynamics at Kinetochores in Living Cells." *Current Biology* 14 (11):953–64. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2004.05.053>.

Hoyt, M. A., L. Totis, and B. T. Roberts. 1991. "S. Cerevisiae Genes Required for Cell Cycle Arrest in Response to Loss of Microtubule Function." *Cell* 66 (3):507–17.

Huang, Haomin, James Hittle, Francesca Zappacosta, Roland S. Annan, Avram Hershko, and Timothy J. Yen. 2008. "Phosphorylation Sites in BubR1 That Regulate Kinetochore Attachment, Tension, and Mitotic Exit." *The Journal of Cell Biology* 183 (4):667–80. <https://doi.org/10.1083/jcb.200805163>.

Huang, Haomin, and Timothy J. Yen. 2009. "BubR1 Is an Effector of Multiple Mitotic Kinases That Specifies Kinetochore: Microtubule Attachments and Checkpoint." *Cell Cycle* 8 (8):1164–67. <https://doi.org/10.4161/cc.8.8.8151>.

Huang, James N., Iha Park, Eric Ellingson, Laurie E. Littlepage, and David Pellman. 2001. "Activity of the APCCdh1 Form of the Anaphase-Promoting Complex Persists until S Phase and Prevents the Premature Expression of Cdc20p." *The Journal of Cell Biology* 154 (1):85–94. <https://doi.org/10.1083/jcb.200102007>.

Huang, Yaling, and Lei Li. 2013. "DNA Crosslinking Damage and Cancer-a Tale of Friend and Foe." *Translational Cancer Research* 2 (3):144.

Huen, Michael S. Y., Robert Grant, Isaac Manke, Kay Minn, Xiaochun Yu, Michael B. Yaffe, and Junjie Chen. 2007. "RNF8 Transduces the DNA-Damage Signal via Histone Ubiquitylation and Checkpoint Protein Assembly." *Cell* 131 (5):901–14. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.09.041>.

Huertas, Pablo. 2010. "DNA Resection in Eukaryotes: Deciding How to Fix the Break." *Nature Structural & Molecular Biology* 17 (1):11–16. <https://doi.org/10.1038/nsmb.1710>.

Hughes, B. T., J. Sidorova, J. Swanger, R. J. Monnat, and B. E. Clurman. 2013. "Essential Role for Cdk2 Inhibitory Phosphorylation during Replication Stress Revealed by a Human Cdk2 Knockin Mutation." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110 (22):8954–59. <https://doi.org/10.1073/pnas.1302927110>.

Hyun, Sun-Yi, Hyo-In Hwan, and Young-Joo Jang. 2014. "Polo-like Kinase-1 in DNA Damage Response." *BMB Reports* 47 (5):249–55. <https://doi.org/10.5483/BMBRep.2014.47.5.061>.

Hyun, Sun-Yi, Badmaarag Sarantuya, Hee-Jae Lee, and Young-Joo Jang. 2013. "APC/CCdh1-Dependent Degradation of Cdc20 Requires a Phosphorylation on CRY-Box by Polo-like Kinase-1 during Somatic Cell Cycle." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 436 (1):12–18. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2013.04.073>.

Ikeda, Masanori, and Kozo Tanaka. 2017. "Plk1 Bound to Bub1 Contributes to Spindle Assembly Checkpoint Activity during Mitosis." *Scientific Reports* 7 (1). <https://doi.org/10.1038/s41598-017-09114-3>.

Izawa, Daisuke, and Jonathon Pines. 2014. "The Mitotic Checkpoint Complex Binds a Second CDC20 to Inhibit Active APC/C." *Nature* 517 (7536):631–34. <https://doi.org/10.1038/nature13911>.

Izumi, Hideki, Y. Matsumoto, T. Ikeuchi, H. Saya, T. Kajii, and S. Matsuura. 2009. "BubR1 Localizes to Centrosomes and Suppresses Centrosome Amplification via Regulating Plk1 Activity in Interphase Cells." *Oncogene* 28 (31):2806–2820.

Jager, Martijn de, John van Noort, Dik C. van Gent, Cees Dekker, Roland Kanaar, and Claire Wyman. 2001. "Human Rad50/Mre11 Is a Flexible Complex That Can Tether DNA Ends." *Molecular Cell* 8 (5):1129–1135.

Jang, Young-Joo, Jae-Hoon Ji, Young-Chul Choi, Chun Jeih Ryu, and Seon-Yle Ko. 2007. "Regulation of Polo-like Kinase 1 by DNA Damage in Mitosis: INHIBITION OF MITOTIC PLK-1 BY PROTEIN PHOSPHATASE 2A." *Journal of Biological Chemistry* 282 (4):2473–82. <https://doi.org/10.1074/jbc.M605480200>.

Jang, Young-Joo, Sheng Ma, Yasuhiko Terada, and Raymond L. Erikson. 2002. "Phosphorylation of Threonine 210 and the Role of Serine 137 in the Regulation of Mammalian Polo-like Kinase." *Journal of Biological Chemistry* 277 (46):44115–20. <https://doi.org/10.1074/jbc.M202172200>.

Johnson, V. L. 2004. "Bub1 Is Required for Kinetochores Localization of BubR1, Cenp-E, Cenp-F and Mad2, and Chromosome Congression." *Journal of Cell Science* 117 (8):1577–89. <https://doi.org/10.1242/jcs.01006>.

Joyce, Eric F., Michael Pedersen, Stanley Tiong, Sanese K. White-Brown, Anshu Paul, Shelagh D. Campbell, and Kim S. McKim. 2011. "Drosophila ATM and ATR Have Distinct Activities in the Regulation of Meiotic DNA Damage and Repair." *The Journal of Cell Biology* 195 (3):359–67. <https://doi.org/10.1083/jcb.201104121>.

Kagami, Yuya, Masaya Ono, and Kiyotsugu Yoshida. 2017. "Plk1 Phosphorylation of CAP-H2 Triggers Chromosome Condensation by Condensin II at the Early Phase of Mitosis." *Scientific Reports* 7 (July). <https://doi.org/10.1038/s41598-017-05986-7>.

Kakarougkas, A, and P A Jeggo. 2014. "DNA DSB Repair Pathway Choice: An Orchestrated Handover Mechanism." *The British Journal of Radiology* 87 (1035):20130685. <https://doi.org/10.1259/bjr.20130685>.

Kakarougkas, Andreas, Amani Ismail, Yoko Katsuki, Raimundo Freire, Atsushi Shibata, and Penny A. Jeggo. 2013. "Co-Operation of BRCA1 and POH1 Relieves the Barriers Posed by 53BP1 and RAP80 to Resection." *Nucleic Acids Research* 41 (22):10298–311. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt802>.

Kang, Young H., Jung-Eun Park, Li-Rong Yu, Nak-Kyun Soung, Sang-Moon Yun, Jeong K. Bang, Yeon-Sun Seong, et al. 2006. "Self-Regulated Plk1 Recruitment to Kinetochores by the Plk1-PBIP1 Interaction Is Critical for Proper Chromosome Segregation." *Molecular Cell* 24 (3):409–22. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2006.10.016>.

Karess, Roger. 2005. "Rod-Zw10-Zwilch: A Key Player in the Spindle Checkpoint." *Trends in Cell Biology* 15 (7):386–92. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2005.05.003>.

Kawashima, S. A., T. Tsukahara, M. Langegger, S. Hauf, T. S. Kitajima, and Y. Watanabe. 2007. "Shugoshin Enables Tension-Generating Attachment of Kinetochores by Loading Aurora to Centromeres." *Genes & Development* 21 (4):420–35. <https://doi.org/10.1101/gad.1497307>.

Khodjakov, Alexey, Richard W. Cole, Berl R. Oakley, and Conly L. Rieder. 2000. "Centrosome-Independent Mitotic Spindle Formation in Vertebrates." *Current Biology* 10 (2):59–67.

Kim, Jae Hyeong, Jaegal Shim, Min-Ju Ji, Yuna Jung, Seoung Min Bong, Young-Joo Jang, Eun-Kyung Yoon, et al. 2014. "The Condensin Component NCAPG2 Regulates Microtubule-kinetochore Attachment through Recruitment of Polo-like Kinase 1 to Kinetochores." *Nature Communications* 5 (August). <https://doi.org/10.1038/ncomms5588>.

Kim, S. T., D. S. Lim, C. E. Canman, and M. B. Kastan. 1999. "Substrate Specificities and Identification of Putative Substrates of ATM Kinase Family Members." *The Journal of Biological Chemistry* 274 (53):37538–43.

Kitada, K, A L Johnson, L H Johnston, and A Sugino. 1993. "A Multicopy Suppressor Gene of the *Saccharomyces Cerevisiae* G1 Cell Cycle Mutant Gene *Dbf4* Encodes a Protein Kinase and Is Identified as *CDC5*." *Molecular and Cellular Biology* 13 (7):4445–57.

Kitamura, Etsushi, Kozo Tanaka, Shinya Komoto, Yoko Kitamura, Claude Antony, and Tomoyuki U. Tanaka. 2010. "Kinetochores Generate Microtubules with Distal Plus Ends: Their Roles and Limited Lifetime in Mitosis." *Developmental Cell* 18 (2):248–59. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2009.12.018>.

Kiyomitsu, Tomomi, Hiroaki Murakami, and Mitsuhiro Yanagida. 2011. "Protein Interaction Domain Mapping of Human Kinetochore Protein Blinkin Reveals a Consensus Motif for Binding of Spindle Assembly Checkpoint Proteins Bub1 and BubR1." *Molecular and Cellular Biology* 31 (5):998–1011. <https://doi.org/10.1128/MCB.00815-10>.

Kiyomitsu, Tomomi, Chikashi Obuse, and Mitsuhiro Yanagida. 2007. "Human Blinkin/AF15q14 Is Required for Chromosome Alignment and the Mitotic Checkpoint through Direct Interaction with Bub1 and BubR1." *Developmental Cell* 13 (5):663–76. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2007.09.005>.

Kline, Susan L., Iain M. Cheeseman, Tetsuya Hori, Tatsuo Fukagawa, and Arshad Desai. 2006. "The Human Mis12 Complex Is Required for Kinetochore Assembly and Proper Chromosome Segregation." *The Journal of Cell Biology* 173 (1):9–17. <https://doi.org/10.1083/jcb.200509158>.

Kotani, Shuji, Stuart Tugendreich, Mika Fujii, Pia-Marie Jorgensen, Nobumoto Watanabe, Christer Hoog, Philip Hieter, and Kazuo Todokoro. 1998. "PKA and MPF-Activated Polo-like Kinase Regulate Anaphase-Promoting Complex Activity and Mitosis Progression." *Molecular Cell* 1 (3):371–380.

Kraft, Claudine, Franz Herzog, Christian Gieffers, Karl Mechtler, Anja Hagting, Jonathon Pines, and Jan-Michael Peters. 2003. "Mitotic Regulation of the Human Anaphase-Promoting Complex by Phosphorylation." *The EMBO Journal* 22 (24):6598–6609.

Kraft, Claudine, Hartmut C. Vodermaier, Sebastian Maurer-Stroh, Frank Eisenhaber, and Jan-Michael Peters. 2005. "The WD40 Propeller Domain of Cdh1 Functions as a Destruction Box Receptor for APC/C Substrates." *Molecular Cell* 18 (5):543–53. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2005.04.023>.

Kramer, Edgar R., Nadja Scheuringer, Alexandre V. Podtelejnikov, Matthias Mann, and Jan-Michael Peters. 2000. "Mitotic Regulation of the APC Activator Proteins CDC20 and CDH1." *Molecular Biology of the Cell* 11 (5):1555–1569.

Krenn, Veronica, Katharina Overlack, Ivana Primorac, Suzan van Gerwen, and Andrea Musacchio. 2014. "KI Motifs of Human Knl1 Enhance Assembly of Comprehensive Spindle Checkpoint Complexes around MELT Repeats." *Current Biology* 24 (1):29–39. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2013.11.046>.

Krenn, Veronica, Annemarie Wehenkel, Xiaozheng Li, Stefano Santaguida, and Andrea Musacchio. 2012. "Structural Analysis Reveals Features of the Spindle Checkpoint Kinase Bub1–kinetochore Subunit Knl1 Interaction." *The Journal of Cell Biology* 196 (4):451–67. <https://doi.org/10.1083/jcb.201110013>.

Krenning, Lenno, Femke M. Feringa, Indra A. Shaltiel, Jeroen van den Berg, and René H. Medema. 2014. "Transient Activation of P53 in G2 Phase Is Sufficient to Induce Senescence." *Molecular Cell* 55 (1):59–72. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2014.05.007>.

Kruhlak, Michael J., Arkady Celeste, Graham Dellaire, Oscar Fernandez-Capetillo, Waltraud G. Müller, James G. McNally, David P. Bazett-Jones, and André Nussenzweig. 2006. "Changes in Chromatin Structure and Mobility in Living Cells at Sites of DNA Double-Strand Breaks." *The Journal of Cell Biology* 172 (6):823–34. <https://doi.org/10.1083/jcb.200510015>.

Kruse, T., G. Zhang, M. S. Y. Larsen, T. Lischetti, W. Streicher, T. Kragh Nielsen, S. P. Bjorn, and J. Nilsson. 2013. "Direct Binding between BubR1 and B56-PP2A Phosphatase Complexes Regulate Mitotic Progression." *Journal of Cell Science* 126 (5):1086–92. <https://doi.org/10.1242/jcs.122481>.

Krystyniak, A., C. Garcia-Echeverria, Claude Prigent, and S. Ferrari. 2006. "Inhibition of Aurora A in Response to DNA Damage." *Oncogene* 25 (3):338–348.

Kulukian, Anita, Joo Seok Han, and Don W. Cleveland. 2009. "Unattached Kinetochores Catalyze Production of an Anaphase Inhibitor That Requires a Mad2 Template to Prime Cdc20 for BubR1 Binding." *Developmental Cell* 16 (1):105–17. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2008.11.005>.

Kusch, Thomas, Laurence Florens, W. Hayes Macdonald, Selene K. Swanson, Robert L. Glaser, John R. Yates, Susan M. Abmayr, Michael P. Washburn, and Jerry L. Workman. 2004. "Acetylation by Tip60 Is Required for Selective Histone Variant Exchange at DNA Lesions." *Science (New York, N.Y.)* 306 (5704):2084–87. <https://doi.org/10.1126/science.1103455>.

Labbe, J. C., A. Picard, G. Peaucellier, J. C. Cavadore, P. Nurse, and M. Doree. 1989. "Purification of MPF from Starfish: Identification as the H1 Histone Kinase P34cdc2 and a Possible Mechanism for Its Periodic Activation." *Cell* 57 (2):253–263.

Lafarga, V., A. Cuadrado, I. Lopez de Silanes, R. Bengoechea, O. Fernandez-Capetillo, and A. R. Nebreda. 2009. "P38 Mitogen-Activated Protein Kinase- and HuR-Dependent Stabilization of P21Cip1 mRNA Mediates the G1/S Checkpoint." *Molecular and Cellular Biology* 29 (16):4341–51. <https://doi.org/10.1128/MCB.00210-09>.

Lampson, Michael A., and Iain M. Cheeseman. 2011. "Sensing Centromere Tension: Aurora B and the Regulation of Kinetochores Function." *Trends in Cell Biology* 21 (3):133–40. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2010.10.007>.

Lampson, Michael A., Kishore Renduchitala, Alexey Khodjakov, and Tarun M. Kapoor. 2004. "Correcting Improper Chromosome–spindle Attachments during Cell Division." *Nature Cell Biology* 6 (3):6–237. <https://doi.org/10.1038/ncb1102>.

Lan, Weijie, and Don W. Cleveland. 2010. "A Chemical Tool Box Defines Mitotic and Interphase Roles for Mps1 Kinase." *The Journal of Cell Biology* 190 (1):21–24.

Lara-Gonzalez, Pablo, Maria I. F. Scott, Maria Diez, Onur Sen, and Stephen S. Taylor. 2011. "BubR1 Blocks Substrate Recruitment to the APC/C in a KEN-Box-Dependent Manner." *Journal of Cell Science* 124 (24):4332–45. <https://doi.org/10.1242/jcs.094763>.

Lara-Gonzalez, Pablo, Frederick G. Westhorpe, and Stephen S. Taylor. 2012. "The Spindle Assembly Checkpoint." *Current Biology* 22 (22):R966–80. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2012.10.006>.

Lee, Dong-Hyun, Sanket S. Acharya, Mijung Kwon, Pascal Drane, Yinghua Guan, Guillaume Adelmant, Peter Kalev, et al. 2014. "Dephosphorylation Enables the Recruitment of

53BP1 to Double-Strand DNA Breaks.” *Molecular Cell* 54 (3):512–25. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2014.03.020>.

Lee, Hee-Jae, Hyo-In Hwang, and Young-Joo Jang. 2010. “Mitotic DNA Damage Response: Polo-like Kinase-1 Is Dephosphorylated through ATM-Chk1 Pathway.” *Cell Cycle* 9 (12):2389–98. <https://doi.org/10.4161/cc.9.12.11904>.

Lee, Hyunsook. 2014. “Cycling with BRCA2 from DNA Repair to Mitosis.” *Experimental Cell Research, DNA DAMAGE AND REPAIR*, 329 (1):78–84. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2014.10.008>.

Lee, Kyung S, Doo-Yi Oh, Young H Kang, and Jung-Eun Park. 2008. “Self-Regulated Mechanism of Plk1 Localization to Kinetochores: Lessons from the Plk1-PBIP1 Interaction.” *Cell Division* 3 (1):4. <https://doi.org/10.1186/1747-1028-3-4>.

Lee, Kyung S., Jung-Eun Park, Young Hwi Kang, Wendy Zimmerman, Nak-Kyun Soung, Yeon-Sun Seong, Sahng-June Kwak, and Raymond L. Erikson. 2008. “Mechanisms of Mammalian Polo-like Kinase 1 (Plk1) Localization: Self-versus Non-Self-Priming.” *Cell Cycle* 7 (2):141–45. <https://doi.org/10.4161/cc.7.2.5272>.

Lénárt, Péter, Mark Petronczki, Martin Steegmaier, Barbara Di Fiore, Jesse J. Lipp, Matthias Hoffmann, Wolfgang J. Rettig, Norbert Kraut, and Jan-Michael Peters. 2007. “The Small-Molecule Inhibitor BI 2536 Reveals Novel Insights into Mitotic Roles of Polo-like Kinase 1.” *Current Biology* 17 (4):304–15. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2006.12.046>.

Leonard, Joanne, Nicholas Sen, Raul Torres, Takashi Sutani, Adam Jarmuz, Katsuhiko Shirahige, and Luis Aragón. 2015. “Condensin Relocalization from Centromeres to Chromosome Arms Promotes Top2 Recruitment during Anaphase.” *Cell Reports* 13 (11):2336–44. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.11.041>.

Li, Jing, Jue Wang, Hong Jiao, Ji Liao, and Xingzhi Xu. 2010. “Cytokinesis and Cancer: Polo Loves ROCK’n’ Rho(A).” *Journal of Genetics and Genomics* 37 (3):159–72. [https://doi.org/10.1016/S1673-8527\(09\)60034-5](https://doi.org/10.1016/S1673-8527(09)60034-5).

Li, Min, Xiao Fang, Zubo Wei, J. Philippe York, and Pumin Zhang. 2009. “Loss of Spindle Assembly Checkpoint-mediated Inhibition of Cdc20 Promotes Tumorigenesis in Mice.” *The Journal of Cell Biology* 185 (6):983–94. <https://doi.org/10.1083/jcb.200904020>.

Li, Rong, and Andrew W. Murray. 1991. “Feedback Control of Mitosis in Budding Yeast.” *Cell* 66 (3):519–531.

Li, Xuan, and Wolf-Dietrich Heyer. 2008. “Homologous Recombination in DNA Repair and DNA Damage Tolerance.” *Cell Research* 18 (1):99–113. <https://doi.org/10.1038/cr.2008.1>.

Liang, Hongqing, Alessandro Esposito, Siddharth De, Suzan Ber, Philippe Collin, Uttam Surana, and Ashok R. Venkitaraman. 2014. “Homeostatic Control of Polo-like Kinase-1 Engenders Non-Genetic Heterogeneity in G2 Checkpoint Fidelity and Timing.” *Nature Communications* 5 (June). <https://doi.org/10.1038/ncomms5048>.



Limbo, Oliver, Charly Chahwan, Yoshiki Yamada, Robertus A.M. de Bruin, Curt Wittenberg, and Paul Russell. 2007. "Ctp1 Is a Cell-Cycle-Regulated Protein That Functions with Mre11 Complex to Control Double-Strand Break Repair by Homologous Recombination." *Molecular Cell* 28 (1):134–46. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2007.09.009>.

Lindon, Catherine, and Jonathon Pines. 2004. "Ordered Proteolysis in Anaphase Inactivates Plk1 to Contribute to Proper Mitotic Exit in Human Cells." *The Journal of Cell Biology* 164 (2):233–41. <https://doi.org/10.1083/jcb.200309035>.

Lindqvist, Arne, Verónica Rodríguez-Bravo, and René H. Medema. 2009. "The Decision to Enter Mitosis: Feedback and Redundancy in the Mitotic Entry Network." *The Journal of Cell Biology* 185 (2):193–202. <https://doi.org/10.1083/jcb.200812045>.

Lipp, J. J., T. Hirota, I. Poser, and J.-M. Peters. 2007. "Aurora B Controls the Association of Condensin I but Not Condensin II with Mitotic Chromosomes." *Journal of Cell Science* 120 (7):1245–55. <https://doi.org/10.1242/jcs.03425>.

Liu, D., G. Vader, M. J. M. Vromans, M. A. Lampson, and S. M. A. Lens. 2009. "Sensing Chromosome Bi-Orientation by Spatial Separation of Aurora B Kinase from Kinetochores Substrates." *Science* 323 (5919):1350–53. <https://doi.org/10.1126/science.1167000>.

Liu, Dan, Mathijs Vleugel, Chelsea B. Backer, Tetsuya Hori, Tatsuo Fukagawa, Iain M. Cheeseman, and Michael A. Lampson. 2010. "Regulated Targeting of Protein Phosphatase 1 to the Outer Kinetochores by KNL1 Opposes Aurora B Kinase." *The Journal of Cell Biology* 188 (6):809–20. <https://doi.org/10.1083/jcb.201001006>.

Liu, Hong, Susannah Rankin, and Hongtao Yu. 2012. "Phosphorylation-Enabled Binding of SGO1-PP2A to Cohesin Protects Sororin and Centromeric Cohesion during Mitosis." *Nature Cell Biology* 15 (1):40–49. <https://doi.org/10.1038/ncb2637>.

Lock, Richard B., and Warren E. Ross. 1990. "Inhibition of P34cdc2 Kinase Activity by Etoposide or Irradiation as a Mechanism of G2 Arrest in Chinese Hamster Ovary Cells." *Cancer Research* 50 (12):3761–3766.

Lohka, Manfred J., Marianne K. Hayes, and James L. Maller. 1988. "Purification of Maturation-Promoting Factor, an Intracellular Regulator of Early Mitotic Events." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 85 (9):3009–3013.

London, N., and S. Biggins. 2014. "Mad1 Kinetochores Recruitment by Mps1-Mediated Phosphorylation of Bub1 Signals the Spindle Checkpoint." *Genes & Development* 28 (2):140–52. <https://doi.org/10.1101/gad.233700.113>.

Lou, Zhenkun, Katherine Minter-Dykhouse, Sonia Franco, Monica Gostissa, Melissa A. Rivera, Arkady Celeste, John P. Manis, et al. 2006. "MDC1 Maintains Genomic Stability by Participating in the Amplification of ATM-Dependent DNA Damage Signals." *Molecular Cell* 21 (2):187–200. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2005.11.025>.

- Lu, Xiongbin, Thuy-Ai Nguyen, and Lawrence A. Donehower. 2005. "Reversal of the ATM/ATR-Mediated DNA Damage Response by the Oncogenic Phosphatase PPM1D." *Cell Cycle* 4 (8):4060–64. <https://doi.org/10.4161/cc.4.8.1876>.
- Lupardus, Patrick J., and Karlene A. Cimprich. 2004. "Checkpoint Adaptation; Molecular Mechanisms Uncovered." *Cell* 117 (5):555–56. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2004.05.005>.
- Ma, Hoi Tang, and Randy Yat Choi Poon. 2016. "TRIP13 Regulates Both the Activation and Inactivation of the Spindle-Assembly Checkpoint." *Cell Reports* 14 (5):1086–99. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.01.001>.
- Maia, Ana R.R., Zaira Garcia, Lilian Kabeche, Marin Barisic, Stefano Maffini, Sandra Macedo-Ribeiro, Iain M. Cheeseman, Duane A. Compton, Irina Kaverina, and Helder Maiato. 2012. "Cdk1 and Plk1 Mediate a CLASP2 Phospho-Switch That Stabilizes Kinetochore–microtubule Attachments." *The Journal of Cell Biology* 199 (2):285–301. <https://doi.org/10.1083/jcb.201203091>.
- Maiato, Helder, Polla J. Hergert, Sara Moutinho-Pereira, Yimin Dong, Kristin J. Vandenbeldt, Conly L. Rieder, and Bruce F. McEwen. 2006. "The Ultrastructure of the Kinetochore and Kinetochore Fiber in *Drosophila* Somatic Cells." *Chromosoma* 115 (6):469–80. <https://doi.org/10.1007/s00412-006-0076-2>.
- Mailand, Niels, Simon Bekker-Jensen, Jiri Bartek, and Jiri Lukas. 2006. "Destruction of Claspin by SCF $\beta$ TrCP Restrains Chk1 Activation and Facilitates Recovery from Genotoxic Stress." *Molecular Cell* 23 (3):307–18. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2006.06.016>.
- Malik, H. S., and S. Henikoff. 2001. "Adaptive Evolution of Cid, a Centromere-Specific Histone in *Drosophila*." *Genetics* 157 (3):1293–98.
- Malkova, A., E. L. Ivanov, and J. E. Haber. 1996. "Double-Strand Break Repair in the Absence of RAD51 in Yeast: A Possible Role for Break-Induced DNA Replication." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93 (14):7131–36.
- Malmanche, Nicolas, Stephanie Owen, Stephen Gegick, Soren Steffensen, John E. Tomkiel, and Claudio E. Sunkel. 2007. "*Drosophila* BubR1 Is Essential for Meiotic Sister-Chromatid Cohesion and Maintenance of Synaptonemal Complex." *Current Biology: CB* 17 (17):1489–97. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2007.07.042>.
- Malureanu, Liviu A., Karthik B. Jeganathan, Masakazu Hamada, Lisa Wasilewski, James Davenport, and Jan M. van Deursen. 2009. "BubR1 N Terminus Acts as a Soluble Inhibitor of Cyclin B Degradation by APC/CCdc20 in Interphase." *Developmental Cell* 16 (1):118–31. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2008.11.004>.
- Mao, Yinghui, Arshad Desai, and Don W. Cleveland. 2005. "Microtubule Capture by CENP-E Silences BubR1-Dependent Mitotic Checkpoint Signaling." *The Journal of Cell Biology* 170 (6):873–80. <https://doi.org/10.1083/jcb.200505040>.

- Mapelli, Marina, Lucia Massimiliano, Stefano Santaguida, and Andrea Musacchio. 2007. "The Mad2 Conformational Dimer: Structure and Implications for the Spindle Assembly Checkpoint." *Cell* 131 (4):730–43. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.08.049>.
- Mardin, Balca R., Fikret G. Agircan, Cornelia Lange, and Elmar Schiebel. 2011. "Plk1 Controls the Nek2A-PP1 $\gamma$  Antagonism in Centrosome Disjunction." *Current Biology* 21 (13):1145–51. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2011.05.047>.
- Mari, Pierre-Olivier, Bogdan I. Florea, Stephan P. Persengiev, Nicole S. Verkaik, Hennie T. Brüggewirth, Mauro Modesti, Giuseppina Giglia-Mari, Karel Bezstarosti, Jeroen AA Demmers, and Theo M. Luiders. 2006. "Dynamic Assembly of End-Joining Complexes Requires Interaction between Ku70/80 and XRCC4." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103 (49):18597–18602.
- Mariño-Ramírez, Leonardo, Maricel G Kann, Benjamin A Shoemaker, and David Landsman. 2005. "Histone Structure and Nucleosome Stability." *Expert Review of Proteomics* 2 (5):719–29. <https://doi.org/10.1586/14789450.2.5.719>.
- Matsumoto, Takumi, Ping-yuan Wang, Wenzhe Ma, Ho Joong Sung, Satoaki Matoba, and Paul M. Hwang. 2009. "Polo-like Kinases Mediate Cell Survival in Mitochondrial Dysfunction." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106 (34):14542–14546.
- Matsumura, S., F. Toyoshima, and E. Nishida. 2007. "Polo-like Kinase 1 Facilitates Chromosome Alignment during Prometaphase through BubR1." *Journal of Biological Chemistry* 282 (20):15217–27. <https://doi.org/10.1074/jbc.M611053200>.
- Matsuoka, Shuhei, Bryan A. Ballif, Agata Smogorzewska, E. Robert McDonald, Kristen E. Hurov, Ji Luo, Corey E. Bakalarski, et al. 2007. "ATR Substrate Analysis Reveals Extensive Protein Networks Responsive to DNA Damage." *Science (New York, N.Y.)* 316 (5828):1160–66. <https://doi.org/10.1126/science.1140321>.
- McClelland, Mark L., Richard D. Gardner, Marko J. Kallio, John R. Daum, Gary J. Gorbsky, Daniel J. Burke, and P. Todd Stukenberg. 2003. "The Highly Conserved Ndc80 Complex Is Required for Kinetochore Assembly, Chromosome Congression, and Spindle Checkpoint Activity." *Genes & Development* 17 (1):101–14. <https://doi.org/10.1101/gad.1040903>.
- McKinley, Kara L., and Iain M. Cheeseman. 2014. "Polo-like Kinase 1 Licenses CENP-A Deposition at Centromeres." *Cell* 158 (2):397–411. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.06.016>.
- Meek, Katheryn, Van Dang, and Susan P. Lees-Miller. 2008. "DNA-PK: The Means to Justify the Ends?" *Advances in Immunology* 99:33–58. [https://doi.org/10.1016/S0065-2776\(08\)00602-0](https://doi.org/10.1016/S0065-2776(08)00602-0).
- Mehta, A., and J. E. Haber. 2014. "Sources of DNA Double-Strand Breaks and Models of Recombinational DNA Repair." *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 6 (9):a016428–a016428. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a016428>.

Meraldi, Patrick, Viji M. Draviam, and Peter K. Sorger. 2004. "Timing and Checkpoints in the Regulation of Mitotic Progression." *Developmental Cell* 7 (1):45–60.

Minoshima, Yukinori, Toshiyuki Kawashima, Koichi Hirose, Yukio Tonozuka, Aie Kawajiri, Ying Chun Bao, Xingming Deng, Masaaki Tatsuka, Shuh Narumiya, and W. Stratford May. 2003. "Phosphorylation by Aurora B Converts MgcRacGAP to a RhoGAP during Cytokinesis." *Developmental Cell* 4 (4):549–560.

Mitchison, Tim, and Marc Kirschner. 1984. "Dynamic Instability of Microtubule Growth." *Nature* 312 (5991):237–42. <https://doi.org/10.1038/312237a0>.

Miyamoto, Tatsuo, Sean Porazinski, Huijia Wang, Antonia Borovina, Brian Ciruna, Atsushi Shimizu, Tadashi Kajii, Akira Kikuchi, Makoto Furutani-Seiki, and Shinya Matsuura. 2011. "Insufficiency of BUBR1, a Mitotic Spindle Checkpoint Regulator, Causes Impaired Ciliogenesis in Vertebrates." *Human Molecular Genetics* 20 (10):2058–70. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddr090>.

Mizuguchi, Gaku, Xuetong Shen, Joe Landry, Wei-Hua Wu, Subhojit Sen, and Carl Wu. 2004. "ATP-Driven Exchange of Histone H2AZ Variant Catalyzed by SWR1 Chromatin Remodeling Complex." *Science (New York, N.Y.)* 303 (5656):343–48. <https://doi.org/10.1126/science.1090701>.

Moshe, Yakir, Jérôme Boulaire, Michele Pagano, and Avram Hershko. 2004. "Role of Polo-like Kinase in the Degradation of Early Mitotic Inhibitor 1, a Regulator of the Anaphase Promoting Complex/Cyclosome." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101 (21):7937–7942.

Moutinho-Santos, Tatiana, Paula Sampaio, Isabel Amorim, Madalena Costa, and Claudio E. Sunkel. 1999. "In Vivo Localisation of the Mitotic POLO Kinase Shows a Highly Dynamic Association with the Mitotic Apparatus during Early Embryogenesis in *Drosophila*." *Biology of the Cell* 91 (8):585–596.

Muir, Kyle W., Marc Kschonsak, Yan Li, Jutta Metz, Christian H. Haering, and Daniel Panne. 2016. "Structure of the Pds5-Scc1 Complex and Implications for Cohesin Function." *Cell Reports* 14 (9):2116–26. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.01.078>.

Musacchio, Andrea. 2015. "The Molecular Biology of Spindle Assembly Checkpoint Signaling Dynamics." *Current Biology* 25 (20):R1002–18. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2015.08.051>.

Musacchio, Andrea, and Arshad Desai. 2017. "A Molecular View of Kinetochore Assembly and Function." *Biology* 6 (1):5. <https://doi.org/10.3390/biology6010005>.

Nasmyth, K., J. M. Peters, and F. Uhlmann. 2000. "Splitting the Chromosome: Cutting the Ties That Bind Sister Chromatids." *Science (New York, N.Y.)* 288 (5470):1379–85.

Neef, Rüdiger, Ulrike Gruneberg, Robert Kopajtich, Xiuling Li, Erich A. Nigg, Herman Sillje, and Francis A. Barr. 2007. "Choice of Plk1 Docking Partners during Mitosis and

Cytokinesis Is Controlled by the Activation State of Cdk1." *Nature Cell Biology* 9 (4):436–44. <https://doi.org/10.1038/ncb1557>.

Neef, Rüdiger, Christian Preisinger, Josephine Sutcliffe, Robert Kopajtich, Erich A. Nigg, Thomas U. Mayer, and Francis A. Barr. 2003. "Phosphorylation of Mitotic Kinesin-like Protein 2 by Polo-like Kinase 1 Is Required for Cytokinesis." *The Journal of Cell Biology* 162 (5):863–76. <https://doi.org/10.1083/jcb.200306009>.

Nicklas, R. B. 1967. "Chromosome Micromanipulation. II. Induced Reorientation and the Experimental Control of Segregation in Meiosis." *Chromosoma* 21 (1):17–50.

Nigg, Erich A., and Tim Stearns. 2011. "The Centrosome Cycle: Centriole Biogenesis, Duplication and Inherent Asymmetries." *Nature Cell Biology* 13 (10):1154–60. <https://doi.org/10.1038/ncb2345>.

Nijenhuis, Wilco, Giulia Vallardi, Antoinette Teixeira, Geert J. P. L. Kops, and Adrian T. Saurin. 2014. "Negative Feedback at Kinetochores Underlies a Responsive Spindle Checkpoint Signal." *Nature Cell Biology* 16 (12):1257–64. <https://doi.org/10.1038/ncb3065>.

Nilsson, Jakob, Mona Yekezare, Jeremy Minshull, and Jonathon Pines. 2008. "The APC/C Maintains the Spindle Assembly Checkpoint by Targeting Cdc20 for Destruction." *Nature Cell Biology* 10 (12):1411–20. <https://doi.org/10.1038/ncb1799>.

Nishi, Ryotaro, Paul Wijnhoven, Carlos le Sage, Jorrit Tjeertes, Yaron Galanty, Josep V. Forment, Michael J. Clague, Sylvie Urbé, and Stephen P. Jackson. 2014. "Systematic Characterization of Deubiquitylating Enzymes for Roles in Maintaining Genome Integrity." *Nature Cell Biology* 16 (10):1016–26. <https://doi.org/10.1038/ncb3028>.

Nishino, Michiya, Yasuhiro Kurasawa, Randall Evans, Sue-Hwa Lin, Bill R. Brinkley, and Li-yuan Yu-Lee. 2006. "NudC Is Required for Plk1 Targeting to the Kinetochores and Chromosome Congression." *Current Biology* 16 (14):1414–21. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2006.05.052>.

Norden, Caren, Manuel Mendoza, Jeroen Dobbelaere, Chitra V. Kotwaliwale, Sue Biggins, and Yves Barral. 2006. "The NoCut Pathway Links Completion of Cytokinesis to Spindle Midzone Function to Prevent Chromosome Breakage." *Cell* 125 (1):85–98. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.01.045>.

Novak, Zsolt A., Alan Wainman, Lisa Gartenmann, and Jordan W. Raff. 2016. "Cdk1 Phosphorylates Drosophila Sas-4 to Recruit Polo to Daughter Centrioles and Convert Them to Centrosomes." *Developmental Cell* 37 (6):545–57. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2016.05.022>.

Nunes Bastos, Ricardo, Sapan R. Gandhi, Ryan D. Baron, Ulrike Gruneberg, Erich A. Nigg, and Francis A. Barr. 2013. "Aurora B Suppresses Microtubule Dynamics and Limits Central Spindle Size by Locally Activating KIF4A." *The Journal of Cell Biology* 202 (4):605–21. <https://doi.org/10.1083/jcb.201301094>.

O'Connell, Christopher B., and Alexey L. Khodjakov. 2007. "Cooperative Mechanisms of Mitotic Spindle Formation." *Journal of Cell Science* 120 (Pt 10):1717–22. <https://doi.org/10.1242/jcs.03442>.

Orthwein, Alexandre, Amélie Fradet-Turcotte, Sylvie M. Noordermeer, Marella D. Canny, Catherine M. Brun, Jonathan Strecker, Cristina Escribano-Diaz, and Daniel Durocher. 2014. "Mitosis Inhibits DNA Double-Strand Break Repair to Guard against Telomere Fusions." *Science (New York, N.Y.)* 344 (6180):189–93. <https://doi.org/10.1126/science.1248024>.

Overlack, Katharina, Ivana Primorac, Mathijs Vleugel, Veronica Krenn, Stefano Maffini, Ingrid Hoffmann, Geert JPL Kops, and Andrea Musacchio. 2015. "A Molecular Basis for the Differential Roles of Bub1 and BubR1 in the Spindle Assembly Checkpoint." *Elife* 4:e05269.

Park, Inai, Mi-Sun Kwon, Sangjin Paik, Hyeonjong Kim, Hae-Ock Lee, Eunhee Choi, and Hyunsook Lee. 2017. "HDAC2/3 Binding and Deacetylation of BubR1 Initiates Spindle Assembly Checkpoint Silencing." *The FEBS Journal*, October. <https://doi.org/10.1111/febs.14286>.

Parker, Laura L., and Helen Piwnicka-Worms. 1992. "Inactivation of the P34<sup>cdc2</sup>-Cyclin B Complex by the Human WEE1 Tyrosine Kinase." *Science* 257 (5078):1955–57.

Patil, Mallikarjun, Navjotsingh Pabla, and Zheng Dong. 2013. "Checkpoint Kinase 1 in DNA Damage Response and Cell Cycle Regulation." *Cellular and Molecular Life Sciences* 70 (21):4009–21. <https://doi.org/10.1007/s00018-013-1307-3>.

Pellegrini, Luca, S. Yu David, Thomas Lo, Shubha Anand, MiYoung Lee, Tom L. Blundell, and Ashok R. Venkitaraman. 2002. "Insights into DNA Recombination from the Structure of a RAD51–BRCA2 Complex." *Nature* 420 (6913):287–293.

Peters, Jan-Michael. 2006. "The Anaphase Promoting Complex/Cyclosome: A Machine Designed to Destroy." *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 7 (9):644–56. <https://doi.org/10.1038/nrm1988>.

Peterson, Shaun E., Yinyin Li, Brian T. Chait, Max E. Gottesman, Richard Baer, and Jean Gautier. 2011. "Cdk1 Uncouples CtIP-Dependent Resection and Rad51 Filament Formation during M-Phase Double-Strand Break Repair." *The Journal of Cell Biology* 194 (5):705–20. <https://doi.org/10.1083/jcb.201103103>.

Petronczki, Mark, Péter Lénárt, and Jan-Michael Peters. 2008. "Polo on the Rise—from Mitotic Entry to Cytokinesis with Plk1." *Developmental Cell* 14 (5):646–59. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2008.04.014>.

Petrovic, Arsen, Shyamal Mosalaganti, Jenny Keller, Marta Mattiuzzo, Katharina Overlack, Veronica Krenn, Anna De Antoni, et al. 2014. "Modular Assembly of RWD Domains on the Mis12 Complex Underlies Outer Kinetochore Organization." *Molecular Cell* 53 (4):591–605. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2014.01.019>.

Petry, Sabine, Aaron C. Groen, Keisuke Ishihara, Timothy J. Mitchison, and Ronald D. Vale. 2013. "Branching Microtubule Nucleation in *Xenopus* Egg Extracts Mediated by Augmin and TPX2." *Cell* 152 (4):768–77. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.12.044>.

Petsalaki, Eleni, Tonia Akoumianaki, Elizabeth J. Black, David A.F. Gillespie, and George Zachos. 2011. "Phosphorylation at Serine 331 Is Required for Aurora B Activation." *The Journal of Cell Biology* 195 (3):449–66. <https://doi.org/10.1083/jcb.201104023>.

Pines, Alex, Christian D. Kelstrup, Mischa G. Vrouwe, Jordi C. Puigvert, Dimitris Typas, Branislav Misovic, Anton de Groot, et al. 2011. "Global Phosphoproteome Profiling Reveals Unanticipated Networks Responsive to Cisplatin Treatment of Embryonic Stem Cells." *Molecular and Cellular Biology* 31 (24):4964–77. <https://doi.org/10.1128/MCB.05258-11>.

Piskadlo, Ewa, Alexandra Tavares, and Raquel A. Oliveira. 2017. "Metaphase Chromosome Structure Is Dynamically Maintained by Condensin I-Directed DNA (de)Catenation." *ELife* 6 (May). <https://doi.org/10.7554/eLife.26120>.

Potapova, Tamara A., John R. Daum, Kendra S. Byrd, and Gary J. Gorbsky. 2009. "Fine Tuning the Cell Cycle: Activation of the Cdk1 Inhibitory Phosphorylation Pathway during Mitotic Exit." *Molecular Biology of the Cell* 20 (6):1737–1748.

Primorac, Ivana, John R. Weir, Elena Chiroli, Fridolin Gross, Ingrid Hoffmann, Suzan Van Gerwen, Andrea Ciliberto, and Andrea Musacchio. 2013. "Bub3 Reads Phosphorylated MELT Repeats to Promote Spindle Assembly Checkpoint Signaling." *ELife* 2:e01030.

Prinz, Florian, Vera Puetter, Simon J. Holton, Dorothee Andres, Christian M. Stegmann, Dennis Kwiatkowski, Stefan Prechtel, et al. 2016. "Functional and Structural Characterization of Bub3·BubR1 Interactions Required for Spindle Assembly Checkpoint Signaling in Human Cells." *Journal of Biological Chemistry* 291 (21):11252–67. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.702142>.

Prinz, Susanne, Ellen S. Hwang, Rosella Visintin, and Angelika Amon. 1998. "The Regulation of Cdc20 Proteolysis Reveals a Role for the APC Components Cdc23 and Cdc27 during S Phase and Early Mitosis." *Current Biology* 8 (13):750–60. [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(98\)70298-2](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(98)70298-2).

Prosser, Suzanna L., and Laurence Pelletier. 2017. "Mitotic Spindle Assembly in Animal Cells: A Fine Balancing Act." *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 18 (3):187–201. <https://doi.org/10.1038/nrm.2016.162>.

Qian, Junbin, Bart Lesage, Monique Beullens, Aleyde Van Eynde, and Mathieu Bollen. 2011. "PP1/Repo-Man Dephosphorylates Mitotic Histone H3 at T3 and Regulates Chromosomal Aurora B Targeting." *Current Biology* 21 (9):766–73. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2011.03.047>.

Qin, Bo, Bowen Gao, Jia Yu, Jian Yuan, and Zhenkun Lou. 2013. "Ataxia Telangiectasia-Mutated- and Rad3-Related Protein Regulates the DNA Damage-Induced G<sub>2</sub>/M

Checkpoint through the Aurora A Cofactor Bora Protein." *Journal of Biological Chemistry* 288 (22):16139–44. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.456780>.

Qiu, Zhijun, Zhenhua Zhang, Anna Roschke, Tamas Varga, and Peter D. Aplan. 2017. "Generation of Gross Chromosomal Rearrangements by a Single Engineered DNA Double Strand Break." *Scientific Reports* 7 (February). <https://doi.org/10.1038/srep43156>.

Rahmani, Zohra, Mary E. Gagou, Christophe Lefebvre, Doruk Emre, and Roger E. Karess. 2009. "Separating the Spindle, Checkpoint, and Timer Functions of BubR1." *The Journal of Cell Biology* 187 (5):597–605. <https://doi.org/10.1083/jcb.200905026>.

Rattner, J. B., and D. P. Bazett-Jones. 1989. "Kinetochore Structure: Electron Spectroscopic Imaging of the Kinetochore." *The Journal of Cell Biology* 108 (4):1209–19.

Reimann, Julie DR, Ellen Freed, Jerry Y. Hsu, Edgar R. Kramer, Jan-Michael Peters, and Peter K. Jackson. 2001. "Emi1 Is a Mitotic Regulator That Interacts with Cdc20 and Inhibits the Anaphase Promoting Complex." *Cell* 105 (5):645–655.

Resnick, Tamar D., David L. Satinover, Fiona MacIsaac, P. Todd Stukenberg, William C. Earnshaw, Terry L. Orr-Weaver, and Mar Carmena. 2006. "INCENP and Aurora B Promote Meiotic Sister Chromatid Cohesion through Localization of the Shugoshin MEI-S332 in *Drosophila*." *Developmental Cell* 11 (1):57–68. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2006.04.021>.

Rieder, C. L. 1982. "The Formation, Structure, and Composition of the Mammalian Kinetochore and Kinetochore Fiber." *International Review of Cytology* 79:1–58.

Rieder, C. L., and S. P. Alexander. 1990. "Kinetochores Are Transported Poleward along a Single Astral Microtubule during Chromosome Attachment to the Spindle in Newt Lung Cells." *The Journal of Cell Biology* 110 (1):81–95.

Rieder, C. L., R. W. Cole, A. Khodjakov, and G. Sluder. 1995. "The Checkpoint Delaying Anaphase in Response to Chromosome Monoorientation Is Mediated by an Inhibitory Signal Produced by Unattached Kinetochores." *The Journal of Cell Biology* 130 (4):941–48.

Rischitor, Patricia E., Karen M. May, and Kevin G. Hardwick. 2007. "Bub1 Is a Fission Yeast Kinetochore Scaffold Protein, and Is Sufficient to Recruit Other Spindle Checkpoint Proteins to Ectopic Sites on Chromosomes." Edited by Daniel Lew. *PLoS ONE* 2 (12):e1342. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0001342>.

Robbins, Jonathan A, and Frederick R Cross. 2010. "Regulated Degradation of the APC Coactivator Cdc20." *Cell Division* 5 (September):23. <https://doi.org/10.1186/1747-1028-5-23>.

Rodionov, Vladimir I., and Gary G. Borisy. 1997. "Microtubule Treadmilling in Vivo." *Science* 275 (5297):215–18. <https://doi.org/10.1126/science.275.5297.215>.

Rodriguez-Bravo, Veronica, John Maciejowski, Jennifer Corona, Håkon Kirkeby Buch, Philippe Collin, Masato T. Kanemaki, Jagesh V. Shah, and Prasad V. Jallepalli. 2014.



“Nuclear Pores Protect Genome Integrity by Assembling a Premitotic and Mad1-Dependent Anaphase Inhibitor.” *Cell* 156 (5):1017–31. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.01.010>.

Rošić, Silvana, Florian Köhler, and Sylvia Erhardt. 2014. “Repetitive Centromeric Satellite RNA Is Essential for Kinetochore Formation and Cell Division.” *The Journal of Cell Biology* 207 (3):335–49. <https://doi.org/10.1083/jcb.201404097>.

Royou, Anne, Mary E. Gagou, Roger Karess, and William Sullivan. 2010. “BubR1- and Polo-Coated DNA Tethers Facilitate Poleward Segregation of Acentric Chromatids.” *Cell* 140 (2):235–45. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.12.043>.

Royou, Anne, Hector Macias, and William Sullivan. 2005. “The Drosophila Grp/Chk1 DNA Damage Checkpoint Controls Entry into Anaphase.” *Current Biology* 15 (4):334–339.

Sakamoto, Takuya, Yayoi Tsujimoto Inui, Shimpei Uraguchi, Takeshi Yoshizumi, Sachihito Matsunaga, Minami Mastui, Masaaki Umeda, Kiichi Fukui, and Toru Fujiwara. 2011. “Condensin II Alleviates DNA Damage and Is Essential for Tolerance of Boron Overload Stress in Arabidopsis.” *The Plant Cell* 23 (9):3533–46. <https://doi.org/10.1105/tpc.111.086314>.

Saleh-Gohari, Nasrollah, Helen E. Bryant, Niklas Schultz, Kayan M. Parker, Tobias N. Cassel, and Thomas Helleday. 2005. “Spontaneous Homologous Recombination Is Induced by Collapsed Replication Forks That Are Caused by Endogenous DNA Single-Strand Breaks.” *Molecular and Cellular Biology* 25 (16):7158–69. <https://doi.org/10.1128/MCB.25.16.7158-7169.2005>.

Sandell, L. L., and V. A. Zakian. 1993. “Loss of a Yeast Telomere: Arrest, Recovery, and Chromosome Loss.” *Cell* 75 (4):729–39.

Santaguida, Stefano, Anthony Tighe, Anna Morena D’Alise, Stephen S. Taylor, and Andrea Musacchio. 2010. “Dissecting the Role of MPS1 in Chromosome Biorientation and the Spindle Checkpoint through the Small Molecule Inhibitor Reversine.” *The Journal of Cell Biology* 190 (1):73–87. <https://doi.org/10.1083/jcb.201001036>.

Sartori, Alessandro A., Claudia Lukas, Julia Coates, Martin Mistrik, Shuang Fu, Jiri Bartek, Richard Baer, Jiri Lukas, and Stephen P. Jackson. 2007. “Human CtIP Promotes DNA End Resection.” *Nature* 450 (7169):509–14. <https://doi.org/10.1038/nature06337>.

Saurin, Adrian T., Maike S. van der Waal, René H. Medema, Susanne M.A. Lens, and Geert J.P.L. Kops. 2011. “Aurora B Potentiates Mps1 Activation to Ensure Rapid Checkpoint Establishment at the Onset of Mitosis.” *Nature Communications* 2 (May):316. <https://doi.org/10.1038/ncomms1319>.

Schittenhelm, Ralf B., Romanas Chaleckis, and Christian F. Lehner. 2009. “Intrakinetochore Localization and Essential Functional Domains of Drosophila Spc105.” *The EMBO Journal* 28 (16):2374–2386.

Schuyler, Scott C., Jenny Y. Liu, and David Pellman. 2003. "The Molecular Function of Ase1p: Evidence for a MAP-Dependent Midzone-Specific Spindle Matrix." *The Journal of Cell Biology* 160 (4):517–28. <https://doi.org/10.1083/jcb.200210021>.

Seki, A., J. A. Coppinger, C.-Y. Jang, J. R. Yates, and G. Fang. 2008. "Bora and the Kinase Aurora A Cooperatively Activate the Kinase Plk1 and Control Mitotic Entry." *Science* 320 (5883):1655–58. <https://doi.org/10.1126/science.1157425>.

Shaltiel, I. A., L. Krenning, W. Bruinsma, and R. H. Medema. 2015. "The Same, Only Different - DNA Damage Checkpoints and Their Reversal throughout the Cell Cycle." *Journal of Cell Science* 128 (4):607–20. <https://doi.org/10.1242/jcs.163766>.

Shao, Genze, Dana R. Lilli, Jeffrey Patterson-Fortin, Kara A. Coleman, Devon E. Morrissey, and Roger A. Greenberg. 2009. "The Rap80-BRCC36 de-Ubiquitinating Enzyme Complex Antagonizes RNF8-Ubc13-Dependent Ubiquitination Events at DNA Double Strand Breaks." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106 (9):3166–3171.

Sharp-Baker, Hilary, and Rey-Huei Chen. 2001. "Spindle Checkpoint Protein Bub1 Is Required for Kinetochore Localization of Mad1, Mad2, Bub3, and CENP-E, Independently of Its Kinase Activity." *The Journal of Cell Biology* 153 (6):1239–1250.

Shen, Xuetong, Gaku Mizuguchi, Ali Hamiche, and Carl Wu. 2000. "A Chromatin Remodelling Complex Involved in Transcription and DNA Processing." *Nature* 406 (6795):541–544.

Shirayama, M., W. Zachariae, R. Ciosk, and K. Nasmyth. 1998. "The Polo-like Kinase Cdc5p and the WD-Repeat Protein Cdc20p/Fizzy Are Regulators and Substrates of the Anaphase Promoting Complex in *Saccharomyces Cerevisiae*." *The EMBO Journal* 17 (5):1336–49. <https://doi.org/10.1093/emboj/17.5.1336>.

Shrivastav, Meena, Leyma P. De Haro, and Jac A. Nickoloff. 2008. "Regulation of DNA Double-Strand Break Repair Pathway Choice." *Cell Research* 18 (1):134–47. <https://doi.org/10.1038/cr.2007.111>.

Smith, Ewan, Nadia Hégarat, Clare Vesely, Isaac Roseboom, Chris Larch, Hansjörg Streicher, Kornelis Straatman, et al. 2011. "Differential Control of Eg5-Dependent Centrosome Separation by Plk1 and Cdk1." *The EMBO Journal* 30 (11):2233–45. <https://doi.org/10.1038/emboj.2011.120>.

Smits, Veronique AJ, Rob Klomp maker, Lionel Arnaud, Gert Rijksen, Erich A. Nigg, and René H. Medema. 2000. "Polo-like Kinase-1 Is a Target of the DNA Damage Checkpoint." *Nature Cell Biology* 2 (9):672–676.

Sobhian, B., G. Shao, D. R. Lilli, A. C. Culhane, L. A. Moreau, B. Xia, D. M. Livingston, and R. A. Greenberg. 2007. "RAP80 Targets BRCA1 to Specific Ubiquitin Structures at DNA Damage Sites." *Science* 316 (5828):1198–1202. <https://doi.org/10.1126/science.1139516>.

Starr, D. A., B. C. Williams, T. S. Hays, and M. L. Goldberg. 1998. "ZW10 Helps Recruit Dynactin and Dynein to the Kinetochore." *The Journal of Cell Biology* 142 (3):763–74.

Steigemann, Patrick, Claudia Wurzenberger, Michael H. A. Schmitz, Michael Held, Julien Guizetti, Sandra Maar, and Daniel W. Gerlich. 2009. "Aurora B-Mediated Abscission Checkpoint Protects against Tetraploidization." *Cell* 136 (3):473–84. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.12.020>.

Stucki, Manuel, Julie A. Clapperton, Duaa Mohammad, Michael B. Yaffe, Stephen J. Smerdon, and Stephen P. Jackson. 2005. "MDC1 Directly Binds Phosphorylated Histone H2AX to Regulate Cellular Responses to DNA Double-Strand Breaks." *Cell* 123 (7):1213–26. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.09.038>.

Stucki, Manuel, and Stephen P. Jackson. 2006. "TH2AX and MDC1: Anchoring the DNA-Damage-Response Machinery to Broken Chromosomes." *DNA Repair* 5 (5):534–43. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2006.01.012>.

Sudakin, V, D Ganoth, A Dahan, H Heller, J Hershko, F C Luca, J V Ruderman, and A Hershko. 1995. "The Cyclosome, a Large Complex Containing Cyclin-Selective Ubiquitin Ligase Activity, Targets Cyclins for Destruction at the End of Mitosis." *Molecular Biology of the Cell* 6 (2):185–97.

Suijkerbuijk, Saskia J.E., Teunis J.P. van Dam, G. Elif Karagöz, Eleonore von Castelmur, Nina C. Hubner, Afonso M.S. Duarte, Mathijs Vleugel, et al. 2012. "The Vertebrate Mitotic Checkpoint Protein BUBR1 Is an Unusual Pseudokinase." *Developmental Cell* 22 (6):1321–29. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2012.03.009>.

Suijkerbuijk, Saskia J.E., Mathijs Vleugel, Antoinette Teixeira, and Geert J.P.L. Kops. 2012. "Integration of Kinase and Phosphatase Activities by BUBR1 Ensures Formation of Stable Kinetochore-Microtubule Attachments." *Developmental Cell* 23 (4):745–55. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2012.09.005>.

Sumara, Izabela, Juan F. Giménez-Abián, Daniel Gerlich, Toru Hirota, Claudine Kraft, Consuelo de la Torre, Jan Ellenberg, and Jan-Michael Peters. 2004. "Roles of Polo-like Kinase 1 in the Assembly of Functional Mitotic Spindles." *Current Biology* 14 (19):1712–1722.

Sunkel, CLAUDIO E., and DAVID M. Glover. 1988. "Polo, a Mitotic Mutant of *Drosophila* Displaying Abnormal Spindle Poles." *Journal of Cell Science* 89 (1):25–38.

Tada, Kenji, Hiroaki Susumu, Takeshi Sakuno, and Yoshinori Watanabe. 2011. "Condensin Association with Histone H2A Shapes Mitotic Chromosomes." *Nature* 474 (7352):477–83. <https://doi.org/10.1038/nature10179>.

Takeda, Shunichi, Kyoko Nakamura, Yoshihito Taniguchi, and Tanya T. Paull. 2007. "Ctp1/CtIP and the MRN Complex Collaborate in the Initial Steps of Homologous Recombination." *Molecular Cell* 28 (3):351–52. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2007.10.016>.

- Tanaka, Kozo, Etsushi Kitamura, Yoko Kitamura, and Tomoyuki U. Tanaka. 2007. "Molecular Mechanisms of Microtubule-Dependent Kinetochore Transport toward Spindle Poles." *The Journal of Cell Biology* 178 (2):269–81. <https://doi.org/10.1083/jcb.200702141>.
- Tanaka, Kozo, Naomi Mukae, Hilary Dewar, Mark van Breugel, Euan K. James, Alan R. Prescott, Claude Antony, and Tomoyuki U. Tanaka. 2005. "Molecular Mechanisms of Kinetochore Capture by Spindle Microtubules." *Nature* 434 (7036):987–94. <https://doi.org/10.1038/nature03483>.
- Tang, Zhanyun, Rajnish Bharadwaj, Bing Li, and Hongtao Yu. 2001. "Mad2-Independent Inhibition of APC Cdc20 by the Mitotic Checkpoint Protein BubR1." *Developmental Cell* 1 (2):227–237.
- Taylor, Stephen S., Edward Ha, and Frank McKeon. 1998. "The Human Homologue of Bub3 Is Required for Kinetochore Localization of Bub1 and a Mad3/Bub1-Related Protein Kinase." *The Journal of Cell Biology* 142 (1):1–11.
- Terasawa, Masahiro, Akira Shinohara, and Miki Shinohara. 2014. "Canonical Non-Homologous End Joining in Mitosis Induces Genome Instability and Is Suppressed by M-Phase-Specific Phosphorylation of XRCC4." Edited by Sue Jinks-Robertson. *PLoS Genetics* 10 (8):e1004563. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1004563>.
- Thornton, Brian R., and David P. Toczyski. 2003. "Securin and B-Cyclin/CDK Are the Only Essential Targets of the APC." *Nature Cell Biology* 5 (12):1090–94. <https://doi.org/10.1038/ncb1066>.
- Tian, W., B. Li, R. Warrington, D. R. Tomchick, H. Yu, and X. Luo. 2012. "Structural Analysis of Human Cdc20 Supports Multisite Degron Recognition by APC/C." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109 (45):18419–24. <https://doi.org/10.1073/pnas.1213438109>.
- Tien, Jerry F., Neil T. Umbreit, Daniel R. Gestaut, Andrew D. Franck, Jeremy Cooper, Linda Wordeman, Tamir Gonen, Charles L. Asbury, and Trisha N. Davis. 2010. "Cooperation of the Dam1 and Ndc80 Kinetochore Complexes Enhances Microtubule Coupling and Is Regulated by Aurora B." *The Journal of Cell Biology* 189 (4):713–23. <https://doi.org/10.1083/jcb.200910142>.
- Tromer, Eelco, Debora Bade, Berend Snel, and Geert J. P. L. Kops. 2016. "Phylogenomics-Guided Discovery of a Novel Conserved Cassette of Short Linear Motifs in BubR1 Essential for the Spindle Checkpoint." *Open Biology* 6 (12):160315. <https://doi.org/10.1098/rsob.160315>.
- Tsukahara, Tatsuya, Yuji Tanno, and Yoshinori Watanabe. 2010. "Phosphorylation of the CPC by Cdk1 Promotes Chromosome Bi-Orientation." *Nature* 467 (7316):719–23. <https://doi.org/10.1038/nature09390>.

Uhlmann, F., F. Lottspeich, and K. Nasmyth. 1999. "Sister-Chromatid Separation at Anaphase Onset Is Promoted by Cleavage of the Cohesin Subunit Scc1." *Nature* 400 (6739):37–42. <https://doi.org/10.1038/21831>.

Vader, Gerben, Jos J W Kauw, René H Medema, and Susanne M A Lens. 2006. "Survivin Mediates Targeting of the Chromosomal Passenger Complex to the Centromere and Midbody." *EMBO Reports* 7 (1):85–92. <https://doi.org/10.1038/sj.embor.7400562>.

Vleugel, M., T. A. Hoek, E. Tromer, T. Sliedrecht, V. Groenewold, M. Omerzu, and G. J. P. L. Kops. 2015. "Dissecting the Roles of Human BUB1 in the Spindle Assembly Checkpoint." *Journal of Cell Science* 128 (16):2975–82. <https://doi.org/10.1242/jcs.169821>.

von Schubert, Conrad, Fabien Cubizolles, Jasmine M. Bracher, Tale Sliedrecht, Geert J.P.L. Kops, and Erich A. Nigg. 2015. "Plk1 and Mps1 Cooperatively Regulate the Spindle Assembly Checkpoint in Human Cells." *Cell Reports* 12 (1):66–78. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.06.007>.

Vugt, Marcel A. T. M. van, Alexandra K. Gardino, Rune Linding, Gerard J. Ostheimer, H. Christian Reinhardt, Shao-En Ong, Chris S. Tan, et al. 2010. "A Mitotic Phosphorylation Feedback Network Connects Cdk1, Plk1, 53BP1, and Chk2 to Inactivate the G2/M DNA Damage Checkpoint." Edited by Michael Lichten. *PLoS Biology* 8 (1):e1000287. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1000287>.

Wadsworth, Patricia. 2005. "Cytokinesis: Rho Marks the Spot." *Current Biology* 15 (21):R871–74. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2005.10.021>.

Wang, Fangwei, Natalia P. Ulyanova, Maike S. van der Waal, Debasis Patnaik, Susanne M.A. Lens, and Jonathan M.G. Higgins. 2011. "A Positive Feedback Loop Involving Haspin and Aurora B Promotes CPC Accumulation at Centromeres in Mitosis." *Current Biology* 21 (12):1061–69. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2011.05.016>.

Weerd, Barbara C. M. van de, Marcel A. T. M. van Vugt, Catherine Lindon, Jos J. W. Kauw, Marieke J. Rozendaal, Rob Klompmaker, Rob M. F. Wolthuis, and René H. Medema. 2005. "Uncoupling Anaphase-Promoting Complex/Cyclosome Activity from Spindle Assembly Checkpoint Control by Deregulating Polo-Like Kinase 1." *Molecular and Cellular Biology* 25 (5):2031–44. <https://doi.org/10.1128/MCB.25.5.2031-2044.2005>.

Wei, Ronnie R., Peter K. Sorger, and Stephen C. Harrison. 2005. "Molecular Organization of the Ndc80 Complex, an Essential Kinetochore Component." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102 (15):5363–5367.

Wigge, Philip A., and John V. Kilmartin. 2001. "The Ndc80p Complex from *Saccharomyces Cerevisiae* Contains Conserved Centromere Components and Has a Function in Chromosome Segregation." *The Journal of Cell Biology* 152 (2):349–60.

Wilde, A., S. B. Lizarraga, L. Zhang, C. Wiese, N. R. Gliksmann, C. E. Walczak, and Y. Zheng. 2001. "Ran Stimulates Spindle Assembly by Altering Microtubule Dynamics and the Balance of Motor Activities." *Nature Cell Biology* 3 (3):221–27. <https://doi.org/10.1038/35060000>.

- Williams, Byron C., ZeXiao Li, Songtao Liu, Erika V. Williams, Garmay Leung, Tim J. Yen, and Michael L. Goldberg. 2003. "Zwilch, a New Component of the ZW10/ROD Complex Required for Kinetochore Functions." *Molecular Biology of the Cell* 14 (4):1379–91. <https://doi.org/10.1091/mbc.E02-09-0624>.
- Woodruff, J. B., O. Wueseke, and A. A. Hyman. 2014. "Pericentriolar Material Structure and Dynamics." *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 369 (1650):20130459–20130459. <https://doi.org/10.1098/rstb.2013.0459>.
- Yamada, Takashi, Eri Tahara, Mai Kanke, Keiko Kuwata, and Tomoko Nishiyama. 2017. "Drosophila Dalmatian Combines Sororin and Shugoshin Roles in Establishment and Protection of Cohesion." *The EMBO Journal* 36 (11):1513–27. <https://doi.org/10.15252/emj.201695607>.
- Yamagishi, Yuya, Ching-Hui Yang, Yuji Tanno, and Yoshinori Watanabe. 2012. "MPS1/Mph1 Phosphorylates the Kinetochore Protein KNL1/Spc7 to Recruit SAC Components." *Nature Cell Biology* 14 (7):746–52. <https://doi.org/10.1038/ncb2515>.
- Yüce, Özlem, Alisa Piekny, and Michael Glotzer. 2005. "An ECT2–centralspindlin Complex Regulates the Localization and Function of RhoA." *The Journal of Cell Biology* 170 (4):571–82. <https://doi.org/10.1083/jcb.200501097>.
- Zhai, Bo, Judit Villén, Sean A. Beausoleil, Julian Mintseris, and Steven P. Gygi. 2008. "Phosphoproteome Analysis of *Drosophila Melanogaster* Embryos." *Journal of Proteome Research* 7 (4):1675–82. <https://doi.org/10.1021/pr700696a>.
- Zhang, Jiayin, Sana Ahmad, and Yinghui Mao. 2007. "BubR1 and APC/EB1 Cooperate to Maintain Metaphase Chromosome Alignment." *The Journal of Cell Biology* 178 (5):773–84. <https://doi.org/10.1083/jcb.200702138>.
- Zhang, Suyang, Leifu Chang, Claudio Alfieri, Ziguang Zhang, Jing Yang, Sarah Maslen, Mark Skehel, and David Barford. 2016. "Molecular Mechanism of APC/C Activation by Mitotic Phosphorylation." *Nature* 533 (7602):260–64. <https://doi.org/10.1038/nature17973>.
- Zhou, Linli, Xiaoying Tian, Cailei Zhu, Fangwei Wang, and Jonathan M. G. Higgins. 2014. "Polo-like Kinase-1 Triggers Histone Phosphorylation by Haspin in Mitosis." *EMBO Reports* 15 (3):273–81. <https://doi.org/10.1002/embr.201338080>.
- Zhu, Mei, Florian Settele, Sachin Kotak, Luis Sanchez-Pulido, Lena Ehret, Chris P. Ponting, Pierre Gönczy, and Ingrid Hoffmann. 2013. "MISP Is a Novel Plk1 Substrate Required for Proper Spindle Orientation and Mitotic Progression." *The Journal of Cell Biology* 200 (6):773–87. <https://doi.org/10.1083/jcb.201207050>.
- Zhu, Tongge, Zhen Dou, Bo Qin, Changjiang Jin, Xinghui Wang, Leilei Xu, Zhaoyang Wang, et al. 2013. "Phosphorylation of Microtubule-Binding Protein Hec1 by Mitotic Kinase Aurora B Specifies Spindle Checkpoint Kinase Mps1 Signaling at the Kinetochore." *Journal of Biological Chemistry* 288 (50):36149–59. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.507970>.

Zimmermann, Michal, and Titia de Lange. 2014. "53BP1: Pro Choice in DNA Repair." *Trends in Cell Biology* 24 (2):108–17. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2013.09.003>.

Zitouni, Sihem, Catarina Nabais, Swadhin Chandra Jana, Adán Guerrero, and Mónica Bettencourt-Dias. 2014. "Polo-like Kinases: Structural Variations Lead to Multiple Functions." *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 15 (7):433–52. <https://doi.org/10.1038/nrm3819>.

Zou, H., T. J. McGarry, T. Bernal, and M. W. Kirschner. 1999. "Identification of a Vertebrate Sister-Chromatid Separation Inhibitor Involved in Transformation and Tumorigenesis." *Science (New York, N.Y.)* 285 (5426):418–22.





# Roles and regulations of Polo and BubR1 on DNA-double-strand breaks during mitosis

The presence of DNA double strand breaks (DSB) during mitosis is challenging for the cell, as it produces fragments of chromosome lacking a centromere. If not processed, this situation can cause genomic instability resulting in improper segregation of the broken fragments into daughter cells. We uncovered a mechanism by which broken chromosomes are faithfully transmitted to daughter cells via the tethering of the two broken chromosome ends. Several proteins including the mitotic kinase BubR1 and Polo are recruited to the breaks and mediate the proper segregation of the broken fragments. However, the mechanism underlying Polo and BubR1 recruitment to DNA breaks is unknown. Moreover, the molecular mechanisms by which Polo and BubR1 mediate the proper segregation of the broken fragments remain to be elucidated.

We first investigated the role and regulation of BubR1 on DNA breaks during mitosis. We show that BubR1 requires Bub3 to localize on the broken chromosome fragment and to mediate its proper segregation. We also find that Fizzy<sup>Cdc20</sup>, a co-factor of the E3 ubiquitin ligase Anaphase-Promoting-Complex/Cyclosome (APC/C), accumulates on DNA breaks in a BubR1 KEN box-dependent manner. A biosensor for APC/C activity demonstrates a BubR1-dependent local inhibition of APC/C around the segregating broken chromosome. These results are consistent with a model where Bub3/BubR1 complex on DNA breaks functions to inhibit the APC/C locally via the sequestration of Fizzy<sup>Cdc20</sup>, thus preserving key substrates from degradation, which promotes proper transmission of broken chromosomes.

In a second study, we investigated the dependency relationship between Polo and BubR1/Bub3/Fizzy on DNA breaks in mitosis. We used a pulsed UV laser to break one chromosome at a define time during mitosis. We immediately follow the recruitment of GFP-tagged proteins to laser-induced DNA breaks. My study reveals that Polo is promptly recruited to DNA breaks and precedes BubR1, Bub3 and Fizzy. In addition, while BubR1, Bub3 and Fizzy dissociation from the breaks coincide with telophase and the nuclear envelope reformation, Polo remains on the breaks well into interphase. We further show that the appearance of BubR1, Bub3 and Fizzy on DNA breaks is delayed in *polo* mutant, indicating that Polo is required for the robust and efficient recruitment of BubR1, Bub3 and Fizzy to DNA breaks. Finally, the timely accumulation of Polo, BubR1 and Bub3 to DNA breaks depends on two components of the DNA Damage Response, the MRN complex (Mre11-Rad50-Nbs1) and ATM (ataxia-telangiectasia mutated).

This work gives us a better understanding on how Polo and BubR1, Bub3 and Fizzy<sup>Cdc20</sup> are recruited to DNA breaks in mitosis and how they promote broken chromosomes segregation.

# Rôles et régulations de Polo et BubR1 sur les cassures double-brin de l'ADN en mitose

La présence de cassures double-brin de l'ADN en mitose est problématique pour les cellules, car cette situation produit des fragments de chromosome ne possédant pas de centromères. En l'absence d'un mécanisme permettant leur prise en charge, ces fragments acentriques n'étant pas attachés au fuseau mitotique, pourraient être ségrégués aléatoirement dans les cellules filles, causant de l'instabilité génomique. Nous avons découvert un mécanisme permettant la transmission correcte des fragments acentriques dans les cellules filles via une structure faisant le lien entre les deux fragments cassés. Plusieurs protéines sont recrutées sur les cassures, comme les kinases mitotiques BubR1 et Polo, et favorisent la ségrégation correcte de ces chromosomes cassés. Cependant, les mécanismes permettant le recrutement de BubR1 et Polo sur les cassures d'ADN en mitose sont inconnus. De plus, les mécanismes moléculaires par lesquels BubR1 et Polo favorisent la ségrégation correcte des fragments acentriques restent à être identifiés.

La première partie de mon projet a été d'étudier le rôle et la régulation de BubR1 sur les cassures d'ADN pendant la mitose. Nous avons montré que BubR1 requiert Bub3 pour se localiser sur les chromosomes cassés afin de favoriser leur ségrégation correcte. Nous avons également détecté l'accumulation de Fizzy<sup>CDC20</sup>, un cofacteur de l'E3 ubiquitine ligase APC/C (Anaphase-Promoting-Complex/Cyclosome), sur les cassures d'ADN, et son recrutement dépend de son interaction avec la KEN Box de BubR1. De plus, l'utilisation d'un substrat synthétique de l'APC/C nous a permis de démontrer que la dégradation par l'APC/C est inhibée localement autour du chromosome cassé, de manière dépendante de BubR1. Ces résultats suggèrent fortement que le complexe BubR1/Bub3 recruté sur les cassures d'ADN inhibe localement l'APC/C en séquestrant Fizzy<sup>CDC20</sup> et empêche ainsi la dégradation de substrats clefs impliqués dans la ségrégation correcte des chromosomes cassés.

La seconde partie de mon projet a été d'étudier les relations d'interdépendance entre Polo et BubR1/Bub3/Fizzy sur les cassures d'ADN en mitose. Nous avons utilisé un laser UV pulsé pour induire des cassures dans un chromosome à un instant précis pendant la mitose, puis nous avons suivi le recrutement de protéines tagguées GFP sur les cassures de chromosome. Cette étude révèle que Polo est rapidement recrutée sur les cassures d'ADN et précède BubR1, Bub3 et Fizzy. De plus, la disparition de BubR1, Bub3 et Fizzy des cassures d'ADN coïncide avec la télophase alors que Polo disparaît des cassures pendant l'interphase. Nous avons également montré que le recrutement de BubR1, Bub3 et Fizzy sur les cassures d'ADN est retardé dans les mutants *polo*, indiquant que Polo est requis pour un recrutement efficace de BubR1, Bub3 et Fizzy sur les cassures d'ADN. Pour finir, nous avons montré que l'accumulation de Polo et BubR1/Bub3/Fizzy sur les cassures d'ADN dépend de deux composants de la réponse aux dommages à l'ADN, le complexe MRN (Mre11-Rad50-Nbs1) et ATM (ataxia-telangiectasia mutated).

Ce travail a permis d'avoir une meilleure compréhension sur la dynamique de recrutement de Polo et BubR1/Bub3/Fizzy sur les cassures d'ADN en mitose. De plus, le mécanisme moléculaire par lequel le complexe BubR1/Bub3 agit pour faciliter la ségrégation des chromosomes cassés a pu être en partie élucidé.