



HAL
open science

La lysine méthyltransférase SETDB1 régule la mitose via la méthylation de la lysine K84 de la protéine INCENP

Gilles Tellier

► To cite this version:

Gilles Tellier. La lysine méthyltransférase SETDB1 régule la mitose via la méthylation de la lysine K84 de la protéine INCENP. Génétique. Université Paris Cité, 2022. Français. NNT : 2022UNIP5116 . tel-04599435

HAL Id: tel-04599435

<https://theses.hal.science/tel-04599435>

Submitted on 3 Jun 2024

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 de doctorat

Université Paris Cité

École doctorale Bio Sorbonne Paris Cité n°562

Épigénétique et Destin Cellulaire

La lysine méthyltransférase SETDB1 régule la mitose via la méthylation de la lysine K84 de la protéine INCENP

Par Tellier Gilles

Thèse de doctorat de Génétique

Dirigée par Dr AIT SI ALI Slimane et Dr JOLIOT Véronique

Présentée et soutenue publiquement à Paris le 26 Septembre 2022

Rapporteurs :

Dr Nicolas REYNOIRD / CR-HDR / CNRS – Université Grenoble Alpes, Grenoble
Dr Sandrine RUCHAUD / CR-HDR / CNRS – Sorbonne Université, Roscoff

Examineur :

Dr. Claudine PIQUE / DR / INSERM – CNRS – Université Paris Cité
Dr Yegor VASSETZKY / DR / CNRS – IGR – Université Paris-Saclay

Directeur de thèse :

Dr Véronique JOLIOT / MCU-HDR / CNRS – Université Paris Cité
Dr Slimane AIT SI ALI / DR / CNRS – Université Paris Cité

Membre invité :

Dr Roger KARESS / DR Émérite / CNRS – IJM – Université Paris Cité

TABLE DES MATIERES

Table des matières	2
Remerciement	7
Résumé	9
Abstract	11
INTRODUCTION	13
Avant-propos	14
PARTIE 1 : LES MODIFICATIONS POST-TRADUCTIONNELLES DE L'ACIDE AMINE LYSINE	17
1. LES MODIFICATIONS POST-TRADUCTIONNELLES DES LYSINES ET LEURS FONCTIONS	17
1.1. Généralités sur les modifications post-traductionnelles de la lysine	17
1.2. Les différentes modifications post-traductionnelles sur lysine et leurs rôles	18
1.2.1. L'acétylation	18
1.2.2. L'ubiquitination	19
1.2.3. La sumoylation.	20
1.2.4. La méthylation	20
1.3. Les modifications post-traductionnelles des histones	21
1.3.1. La phosphorylation des histones	23
1.3.2. L'acétylation des histones	23
1.3.3. L'ubiquitination des histones	24
1.3.4. La méthylation des histones	25
2. LES ROLES DE LA METHYLATION DES LYSINES	25

2.1.	Généralités-----	27
2.2.	La lysine : une plateforme de modifications post-traductionnelles-----	27
2.3.	Les lysines méthyltransférases-----	30
2.3.1.	Généralités-----	30
2.3.2.	Les lysines méthyltransférases spécifiques de H3K9-----	32
3.	La lysine méthyltransférase SETDB1-----	38
3.1.	Le rôle historique de SETDB1 : la (tri-)méthylation de H3K9, clé de la dynamique chromatinienne	38
3.2.	Les cibles non histone de SETDB1-----	41
3.2.1.	La méthylation de UBF-----	41
3.2.2.	La méthylation de p53-----	43
3.2.3.	La méthylation de AKT-----	44
3.3.	SETDB1 est une enzyme clé dans de nombreux cancers-----	45
Partie 2 : Le complexe CPC et la mitose-----		49
1.	La mitose-----	49
1.1.	Le cycle cellulaire-----	49
2.	Régulation de la mitose-----	51
2.1.	Les complexes Cycline/CDK-----	51
2.2.	Les complexes Condensine-----	54
2.3.	Le complexe APC/C-----	56
2.3.1.	Présentation du complexe-----	56
2.3.2.	Activation du complexe APC/C-----	57
2.3.3.	Les cibles du complexe APC/C-----	58
2.4.	Le complexe CPC-----	59

2.4.1.	La kinase Aurora B -----	61
2.4.2.	La protéine du centromère interne, INCENP -----	62
2.4.3.	La Survivine et la Boréaline -----	64
3.	La régulation du complexe CPC -----	66
3.1.	Le complexe CPC en interphase et en début de mitose-----	66
3.1.1.	Le CPC en interphase -----	66
3.1.2.	Le CPC en début de mitose-----	66
3.1.3.	Le CPC en fin de mitose -----	70
3.1.4.	Le CPC durant la cytokinèse-----	70
4.	Dérégulation de la mitose et physiopathologie-----	72
4.1.	Les sources d'erreurs mitotiques -----	73
4.2.	Les conséquences des erreurs en mitose -----	74
	RESULTATS -----	76
	Partie 1 : Identification globale des substrats potentiels de SETDB1 -----	77
1.	Scan des modifications post-traductionnelles (PTMscan) : <i>combinaison du SILAC (Stable Isotope Labelling using Amino acids in Cell culture), de l'immunoprécipitation et de la spectrométrie de masse</i> 77	
2.	Identification des cibles potentielles grâce à la méthode de MBT pull-down -----	81
2.1.	Identification des substrats nucléaires non histones de SETDB1 -----	83
2.2.	Identification des cibles cytoplasmiques de SETDB1 -----	91
	SETDB1 regulates mitotic progression via direct methylation of the Chromosome Passenger	
	Complex subunit INCENP-----	95
1.	ABSTRACT -----	96
2.	INTRODUCTION -----	97
3.	MATERIAL AND METHODS -----	99

Cell lines and cell culture-----	99
MBT pull-down	99
<i>In vitro</i> Methylation Assay-----	100
Protein extracts	101
Co-immunoprecipitation-----	101
Western blot	102
4. RESULTS-----	104
4.1. The Chromosome Passenger Complex (CPC) subunits are enriched in the MBT pull-down assay in a SETDB1-dependent manner-----	104
4.2. SETDB1 methylates INCENP on lysine 84-----	104
4.3. INCENP K84R mutant is cytotoxic and induces DNA bridges-----	106
4.4. INCENP K84R mutation did not impact the CPC integrity-----	106
4.5. INCENP K84R mutant induce micronuclei and binucleated cells-----	107
4.6. Lagging chromosomes in anaphase with INCENP K84R induction-----	108
5. DISCUSSION-----	110
6. REFERENCES-----	112
7. Figure legend-----	139
DISCUSSION-----	147
Partie 1 : SETDB1 dans la régulation de la progression mitotique-----	148
1. Dynamique de la méthylation de INCENP par SETDB1 durant la mitose-----	149
2. SETDB1 méthyle d'autres protéines essentielles A la progression mitotique-----	152
3. La méthylation dans la régulation du cycle cellulaire-----	154
Partie 2 : Les cibles non histones de SETDB1 : <i>discussion des études de méthylome par protéomique</i>-----	156
1. Implication de SETDB1 dans les régulations des ARN-----	156

1.1.	Méthylation par SETDB1 de complexes régulant la traduction ? -----	158
1.2.	Reconnaissance de l'ARN méthylé par SETDB1 ?-----	159
2.	SETDB1 dans la signalisation intracellulaire -----	161
	RÉFÉRENCES -----	163

REMERCIEMENT

Tout d'abord, je souhaite remercier le Dr. Claudine PIQUE pour avoir accepté d'être la présidente de ma thèse. Je souhaite également remercier le Dr. Nicolas Reynoird et le Dr. Sandrine RUCHAUD d'avoir été rapporteur/trice de ma thèse et de m'avoir aidée à améliorer ce manuscrit. Enfin, je souhaite remercier le Dr. Yegor VASSETZKI pour avoir accepté d'être examinateur de ma thèse. Je souhaite également remercier le Pr Roger KARESS d'avoir accepté de participer en tant que membre invité à mon jury de thèse ainsi que son aide tout au long de ma thèse à travers le comité de suivi avec le Dr Arnaud Echard que je remercie pour l'aide qu'il m'a fourni pour la réalisation dans mes travaux de thèse.

Je voudrais spécialement remercier mes directeur/trice de thèse. Merci Slimane de m'avoir accueillie dans ton équipe, de m'avoir aidé durant ses nombreuses années (et aussi supporter). Merci à Véronique pour m'avoir toujours soutenu durant ma thèse dans tous les moments, j'ai toujours pu compter sur toi durant toutes ces années au sein du laboratoire. Tu m'as appris énormément aussi bien sur le plan personnel que professionnel. Merci pour ta patience, merci de m'avoir supporté et de ne m'avoir jamais lâché. Un petit mot aussi pour Jonathan et Valérie directeur et directrice de l'UMR7216 Épигénétiques et Destin Cellulaire, pour l'accueil au sein de l'unité, pour votre disponibilité, votre aide et pour tous vos conseils avisés.

Je voudrais ensuite remercier tous les membres de mon équipe d'accueil (anciens et actuels) avec qui nous avons vécu une grande aventure tous ensemble. Merci beaucoup Lolo et Phiphi (c'était la bonne époque les sushis le vendredi midi) pour m'avoir aidée à commencer ma thèse et de m'avoir permis de m'intégrer aussi bien à mon équipe d'accueil.

Un grand merci à Laurence et Katia pour leurs grandes gentillesse, leurs aides essentielles dans l'ensemble des expériences (parce que ce n'était pas facile la mitose !) que j'ai pu mener ainsi que leur disponibilité.

Je remercie grandement Paola avec qui j'ai passé beaucoup de bons moments de joie et de partage. J'aimerais aussi remercier Vlada et Alice que j'ai

beaucoup embêté amicalement durant l'ensemble de ma période au laboratoire qui m'a permis de me défouler un peu.

Je remercie également Claire et Florent avec qui j'ai passé beaucoup de temps à échanger autour de la science au sens large avec beaucoup de débat provocateur (oui les cailloux sont vivants), avec qui j'ai toujours pu parler librement de tout et qui m'ont beaucoup soutenu durant ma thèse.

J'aimerais remercier Baptiste qui a été mon acolyte durant toute la thèse aussi bien pour aller boire des bières que pour discuter foot dans les couloirs du labo. On aura fait notre thèse ensemble et je n'aurai pas pu avoir un meilleur coéquipier.

Je remercie également Sandra, Juliette, Nelly, Kevin et tous ceux que j'oublie et qui ont été là au début, pendant et qui seront là après ma thèse avec qui j'ai beaucoup (trop ?) bu de bières et pour leur bonne humeur au quotidien.

Je remercie également ma famille pour tout le soutien durant ma thèse et d'avoir été présent.

Pour finir, je remercie ma choupette Robi, avec qui j'ai partagé ma thèse tout au long de ma thèse. Elle a su être là au quotidien dans le bon comme dans les mauvais moments. Elle a toujours su comment me remonter le moral dans les moments difficiles. Son soutien inconditionnel m'a permis d'arriver au bout de cette aventure. Un petit mot aussi pour Ringo, qui par ses câlins et sa petite bouille a toujours pu me donner le sourire.

Je finirais par un hommage plus qu'un merci, pour Éric qui n'a pu être présent durant cette aventure, mais qui je sais que de là-haut a pu voir mon évolution, dont il a grandement participé en me mettant sur de bons rails.

RESUME

La lysine méthyltransférase SETDB1 régule la mitose via la méthylation de la lysine K84 de la protéine INCENP

SETDB1 est une lysine méthyltransférase (KMT) de la famille SUV39 (Suv39h1, G9a, GLP, SETDB1), qui méthyle la lysine 9 de l'histone H3 (H3K9), modification principalement impliquée dans la répression génique. Une dérégulation de ces enzymes a été associée à la tumorigenèse, notamment grâce à son action sur les gènes suppresseurs de tumeur, contrôlant ainsi la croissance, l'invasion et la migration cellulaire. Au-delà des histones, tous les membres de la famille SUV39 méthylent de nombreux substrats non histones, dont UBF, p53, DNMT1, HP1, AKT et p63, impliqués dans la tumorigenèse.

Contrairement à d'autres KMTs, qui sont nucléaires, SETDB1 est principalement localisée dans le cytoplasme dans plusieurs types cellulaires, où SETDB1 est enzymatiquement active.

Mon projet visait à identifier de nouveaux substrats non histones et/ou partenaires cytoplasmiques de SETDB1 dans des fibroblastes et des cellules souches embryonnaires. Pour cela, nous avons utilisé à la fois une approche PTM Scan (contre les lysines) couplée à SILAC (Stable Isotope Labeling by Amino acids in Cell culture), et MBT pull-down (enrichissement de protéines méthylées et de leurs partenaires à l'aide de la protéine L3MBTL1 couplée à la spectrométrie de masse ou MS), ainsi que des analyses de TAP-tag couplées à la MS. Ces approches nous ont permis d'identifier des protéines non histones, cibles potentielles de SETDB1, protéines principalement impliquées dans le cycle cellulaire et la progression mitotique, la transcription et la traduction. Mon projet principal s'est ensuite concentré sur l'étude des substrats non histones de SETDB1 impliqués dans la condensation et la ségrégation des chromosomes. Nos approches globales ont permis d'identifier des membres des complexes CPC (Chromosome Passenger Complex), Condensin II et Cohésine comme cibles de SETDB1.

Je me suis concentré sur la caractérisation de INCENP, sous unité du complexe CPC. J'ai montré que INCENP et SETDB1 interagissent et que SETDB1 méthyle in vitro la lysine 84 de INCENP. J'ai réalisé des études fonctionnelles afin de caractériser le rôle biologique de K84 en utilisant un mutant K84R (arginine à la place de la lysine 84). J'ai trouvé que la surexpression de ce mutant de façon transitoire dans des cellules NIH3T3 a un effet délétère dominant négatif. J'ai ensuite dû construire des lignées stables de NIH3T3 exprimant les formes normale ou mutante de INCENP de façon inductible. Les lignées INCENP K84R montrent des phénotypes particuliers comme des cellules binucléées, des micronoyaux et la présence d'ADN restant dans le pont cytoplasmique entre les cellules filles en cytokinèse. Ces phénotypes pourraient résulter d'une altération de la ségrégation des chromosomes et de défauts de mitose.

Je poursuis l'analyse de ces phénotypes et cherche à caractériser les mécanismes moléculaires impliqués. Actuellement, j'ai établi des lignées stables exprimant l'histone H2B-GFP et les formes normales ou mutantes de INCENP de façon inductible. Ces approches avec des cellules exprimant des protéines fluorescentes permettront de suivre en vidéo-microscopie la division des cellules afin de mieux caractériser les défauts de séparation de chromosomes liés à l'expression du mutant INCENP K84R. Quant aux mécanismes moléculaires, j'analyse par immunoprécipitation la composition du complexe CPC en présence de la forme normale ou mutante de INCENP.

Mots clés : SETDB1, INCENP, Mitose, Méthylation

ABSTRACT

The lysine methyltransferase SETDB1 regulates mitosis through K84 lysine methylation of INCENP protein

SETDB1 is a lysine methyltransferase (KMT) of the SUV39 family (Suv39h1, G9a, GLP, SETDB1), which methylates lysine 9 of histone H3 (H3K9), a modification mainly involved in gene repression. Dysregulation of these enzymes has been associated with tumorigenesis, in particular through its action on tumor suppressor genes, thus controlling cell growth, invasion and migration. Beyond histones, all members of the SUV39 family methylate many non-histone substrates, including UBF, p53, DNMT1, HP1, AKT and p63, involved in tumorigenesis.

Unlike other KMTs, which are nuclear, SETDB1 is primarily localized in the cytoplasm in several cell types, where SETDB1 is enzymatically active.

My project aimed to identify new non-histone substrates and/or cytoplasmic partners of SETDB1 in fibroblasts and embryonic stem cells. For this, we used both a PTM Scan approach (against lysine) coupled with SILAC (Stable Isotope Labeling by Amino acids in Cell culture), and MBT pull-down (enrichment of methylated proteins and their partners at the using L3MBTL1 protein coupled to mass spectrometry or MS), as well as TAP-tag analyzes coupled to MS. These approaches have allowed us to identify non-histone proteins, potential targets of SETDB1, mainly involved in cell cycle and mitotic progression, transcription and translation. My main project then focused on the study of non-histone substrates of SETDB1 involved in chromosome condensation and segregation. Our global approaches have identified members of the CPC (Chromosome Passenger Complex), Condensin II and Cohesin complexes as potential targets of SETDB1.

I focused on the characterization of INCENP, a subunit of the CPC complex. I showed that INCENP and SETDB1 interact and that SETDB1 methylates lysine 84 of INCENP in vitro. I carried out functional studies in order to characterize the biological role of K84 using a K84R mutant (arginine instead of lysine 84). I found that transient overexpression of this mutant in NIH3T3 cells has a dominant negative and deleterious

effect. I constructed stable cell lines of NIH3T3 expressing the normal or mutant forms of INCENP in an inducible manner. The INCENP K84R lines show particular phenotypes such as binucleated cells, micronuclei and the presence of DNA remaining in the cytoplasmic bridge between the daughter cells in cytokinesis. These phenotypes could result from impaired chromosome segregation and defects in mitosis.

I continue to analyze these phenotypes and seek to characterize the molecular mechanisms involved. I have established NIH3T3 lines stably expressing histone H2B-GFP and normal or mutant forms of INCENP in an inducible manner. These approaches with cells expressing fluorescent proteins will make it possible to monitor cell division by video-microscopy in order to better characterize the defects in chromosome separation linked to the expression of the INCENP K84R mutant. As for the molecular mechanisms, I analyze by immunoprecipitation the composition of the CPC complex in the presence of the normal or mutant form of INCENP.

Keywords : SETDB1, INCENP, Mitosis, Methylation

INTRODUCTION

AVANT-PROPOS

Depuis le début des années 1990 et avec les différents projets consistant à déchiffrer le génome à travers son séquençage, les chercheurs du monde entier ont pu mettre en évidence de nombreuses couches de régulations des mécanismes cellulaires. Tout d'abord, le monde de la génétique pensait pouvoir tout comprendre d'une cellule lorsque l'on arriverait à séquencer l'ensemble de l'ADN qu'elle contient. Par la suite, les chercheurs ont pu mettre en évidence que malgré une connaissance bien plus grande des génomes, la séquence d'ADN seule ne permet pas d'avoir toutes les informations sur le fonctionnement d'une cellule. C'est alors qu'à la fin des années 1990, les chercheurs se sont intéressés à ce qui pourrait permettre de comprendre les dynamiques permettant l'expression différentielle des gènes, faisant suite à une étude sur les mécanismes de régulation de la transcription impliquant des transactivateurs ou des répresseurs de transcription. Ces recherches ont mis en lumière le problème de l'hérédité de ces régulations de la transcription, c'est alors qu'apparut la notion des régulations épigénétiques. L'épigénétique peut être définie comme l'ensemble des mécanismes permettant de réguler l'expression des gènes dans le temps et dans l'espace sans altérer la séquence ADN et qui est héréditaire.

En réalité, la notion d'épigénétique réapparaît à la fin des années 90 puisqu'elle fut introduite bien avant par Conrad Hal Waddington qui en 1942 proposait un modèle d'étude liant environnement et gènes dans le but de comprendre les phénotypes (Waddington, 2011). C'est seulement dans le début des années 2000 que les expériences et les résultats dans ce domaine se sont multipliés. Les protéines histones et certaines modifications post-traductionnelles (notamment l'acétylation) étaient déjà connues. Cependant, l'identification des enzymes permettant les différentes modifications post traductionnelles des histones et leurs associations avec la régulation de la transcription des gènes (activation ou répression) ont permis des avancées très importantes dans la compréhension des régulations différentielles des gènes associées aux changements de destin cellulaire. Les épigénéticiens proposent alors d'associer des modifications post-traductionnelles des histones avec des statuts des gènes (actif/réprimé) ou à un état de condensation de la chromatine bien défini.

Ces recherches ont conduit à proposer une théorie appelée « le code des histones » permettant de « prédire » l'expression d'un gène.

L'étude approfondie des enzymes impliquées dans les modifications des histones a permis de montrer qu'elles n'étaient pas uniquement capables de modifier les histones mais aussi d'autres protéines. Certaines modifications post-traductionnelles sont déjà bien connues – la phosphorylation par exemple – et leurs fonctions sur les histones et sur les protéines semblent être similaires. Mais quel peut être le rôle d'une modification post-traductionnelle ?

Bien que je détaille ce sujet plus loin, je vais déjà introduire la notion de modification post-traductionnelle dans cet avant-propos. La séquence en acide aminé d'une protéine est essentielle afin de définir sa structure tridimensionnelle et donc définir sa fonction, cette structure peut alors être modifiée de manière dynamique afin d'affiner sa fonction. En effet, une protéine, peut être active ou inactive, stable ou dégradée, monomérique ou dans un complexe multiprotéique et ces changements peuvent être régulés par des modifications post traductionnelles. Certaines modifications vont permettre de changer légèrement et localement la structure de la protéine ou bien être reconnaissables par d'autres protéines. Toutes les modifications post-traductionnelles ont des fonctions distinctes que l'on pourrait comparer aux différents accessoires d'un couteau suisse. Cependant, certaines sont moins bien comprises à ce jour, comme la méthylation des lysines, sur laquelle j'ai travaillé durant mes travaux de thèse.

La méthylation et les enzymes qui établissent cette modification sont essentielles dans de nombreux processus cellulaires et moléculaires. Cependant, nous ne sommes qu'au début des études dans ce domaine. Des dysfonctionnements dans ces processus, que je détaillerai dans ce manuscrit, sont associés à de nombreuses maladies comme notamment un grand nombre de cancers. Les enzymes responsables des méthylations sur histones sont très souvent impliquées et étudiées dans les cancers car elles impactent directement l'expression des oncogènes et des gènes suppresseurs de tumeurs. Mes travaux ont pu mettre en évidence qu'une des cibles non histones de ces enzymes est une protéine essentielle lors de la division cellulaire. Cette découverte suggère que certaines enzymes impliquées dans la progression tumorale à travers l'action sur l'expression des gènes pourraient être

également impliquées dans cette même progression à travers leurs actions sur les protéines clés de la division cellulaire, qui est également largement dérégulée dans les cancers.

Je propose dans ce manuscrit une étude sur une des enzymes majeures de la méthylation des histones, appelée SETDB1, et son impact sur la division cellulaire à travers la méthylation de protéines non histones.

PARTIE 1 : LES MODIFICATIONS POST- TRADUCTIONNELLES DE L'ACIDE AMINE LYSINE

Dans cette partie, je vais aborder les modifications post-traductionnelles de la lysine et leurs rôles. Je vais présenter également les enzymes responsables de l'établissement ou de l'effacement de ces modifications qui sont réversibles. Je passerai en revue les principales modifications connues pour cet acide aminé pour finir en me concentrant la méthylation par l'enzyme SETDB1, qui est l'objet d'étude central de mes travaux de thèse.

1. LES MODIFICATIONS POST-TRADUCTIONNELLES DES LYSINES ET LEURS FONCTIONS

Il existe de nombreuses modifications post-traductionnelle chez les eucaryotes avec plus de 300 modifications recensées (Jensen, 2004). Parmi ces modifications, il est possible de distinguer deux types de modification, les clivages protéiques et les modifications par ajout de groupements chimique ou de peptides sur les chaines latérales des acides aminées. Dans ce chapitre, nous nous intéresserons à ce deuxième type de modification. Bien que de nombreux acides aminés peuvent être modifiés, je développerai uniquement les modifications sur l'acide aminé lysine.

1.1. Généralités sur les modifications post-traductionnelles de la lysine

La lysine (K), codée par les codons AAG et AAA, est un des neuf acides aminés essentiels chez l'homme. La lysine est classée parmi les acides aminés basiques, avec l'arginine et l'histidine (Drechsel, 1889). L'acide aminé lysine est parmi ceux qui peuvent être le plus modifié ; il existe plus d'une vingtaine de modifications post-traductionnelles de la lysine qui sont réversibles ou irréversibles. Les principales modifications sur les lysines ainsi que les mieux décrites sont l'acétylation, la méthylation, l'ubiquitination et la sumoylation (**Figure 1**). Les modifications sur lysines interviennent dans de nombreux processus biologiques, tels que la régulation de

l'expression des gènes (notamment grâce aux modifications sur histones), la stabilité des protéines (dégradation par le protéasome) ou les interactions protéines-protéines (reconnaissance spécifique par une protéine d'une lysine modifiée).

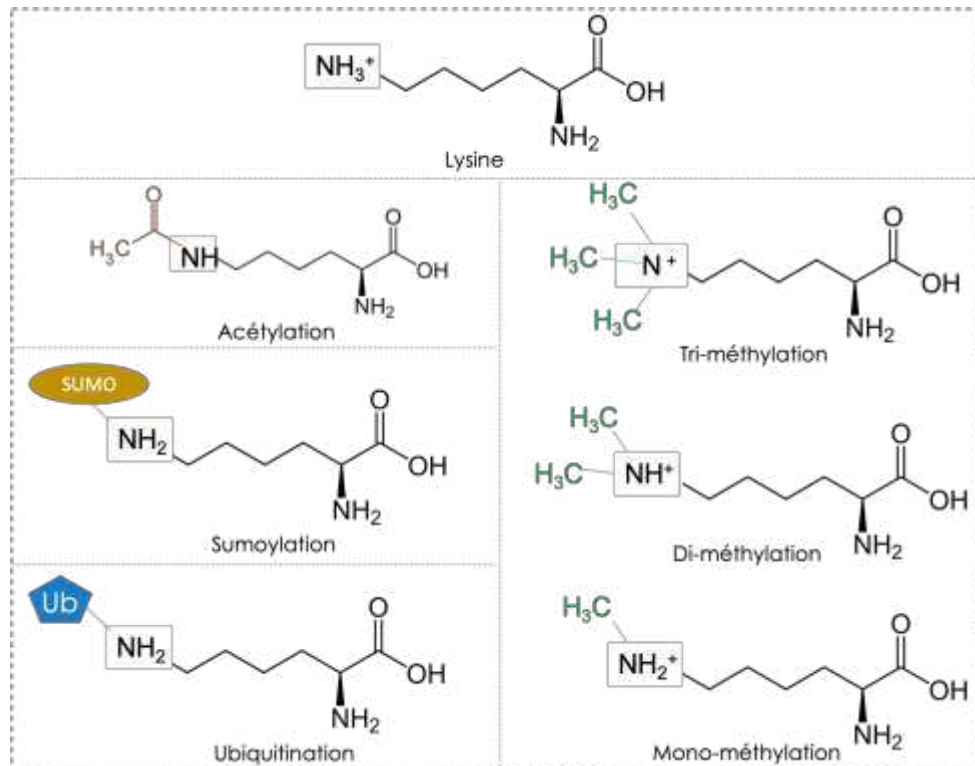


Figure 1 : Principales modifications de la lysine.

Les quatre modifications post-traductionnelles principales de la lysine sont représentées ci-dessus : lysine non modifiée, l'acétylation, l'ubiquitination, la sumoylation et les trois niveaux de méthylation.

1.2. Les différentes modifications post-traductionnelles sur lysine et leurs rôles

1.2.1. L'acétylation

L'acétylation est l'ajout d'un groupe acétyle sur l'amine primaire ϵ (carbone ϵ de la chaîne) de la lysine. L'acétylation permet notamment la neutralisation des charges positives, modifie la taille de la chaîne latérale du résidu lysine et sa structure (Grunstein, 1997). Cela va alors induire des modifications de la structure

tridimensionnelle de la protéine pouvant réguler ainsi sa fonction ou l'interaction avec ses partenaires. La lysine acétylée est reconnue par les bromodomains (Ntranos & Casaccia, 2016). Ces domaines sont par exemple présents dans certaines protéines coactivatrices de la transcription comme la protéine CBP (CREB binding protein) qui possède par ailleurs une activité lysine acétyltransférase (Bannister & Kouzarides, 1996; X. J. Yang, 2004). Les enzymes qui établissent les acétylations sont appelés des lysines acétyltransférases (KAT), initialement appelées des histones acétyltransférases (HAT) (Kuo et al., 1998; Seto & Yoshida, 2014). Cette modification étant réversible, il existe également des enzymes responsables de la désacétylation que l'on appelle lysine désacétylases (KDAC), initialement appelées HDAC.

1.2.2. L'ubiquitination

L'ubiquitination est une modification post-traductionnelle établie par des ubiquitine ligases qui peut être réversible grâce aux USP (Ubiquitin Specific Peptidases). Cette modification consiste en l'ajout d'une ou plusieurs protéines ubiquitine possédant un poids moléculaire d'environ 8 KDa. Il existe deux cas d'ubiquitination connus. D'un côté, la poly-ubiquitination qui consiste en l'ajout d'une chaîne d'ubiquitine sur un résidu lysine qui aura pour finalité d'adresser la protéine modifiée au protéasome, ce qui entraînera sa dégradation (Pickart, 1998; K. D. Wilkinson, 1995). Bien qu'il existe différentes cibles d'ubiquitination, la poly-ubiquitination de la lysine 48 (K48) semblent être le principal signal de dégradation du protéasome et le plus étudié (Thrower et al., 2000). L'ubiquitination est essentielle pour l'adressage car elle est reconnue par un domaine appelé UIM (Ubiquitin-Interacting Motif) qui est par exemple présent sur la sous unité S5 α du protéasome 26S (K. D. Wilkinson, 1995). Ce mécanisme est retrouvé notamment dans la régulation des cyclines au cours du cycle cellulaire ce que je développerai dans la deuxième partie de cette introduction. Il existe également un autre type de poly-ubiquitination sur la lysine 63 (K63) des protéines cellulaires qui les dirige vers d'autres destins, en particulier le trafic endosomal vers le lysosome, la signalisation intracellulaire et la réparation de l'ADN (Ikeda & Dikic, 2008).

D'un autre côté, la mono-ubiquitination qui agira notamment dans la signalisation ou dans la régulation de la localisation d'une protéine. Par exemple, durant l'anaphase, Aurora B se translocalise vers la zone médiane du fuseau mitotique, suite à sa mono-ubiquitination dépendante de CRL3KLHL21 (une ubiquitine ligase associée à une protéine de liaison comme KLHL21) au niveau des kinétochores (Courtheoux et al., 2016; Maerki et al., 2009).

1.2.3. La sumoylation.

La sumoylation est l'addition covalente sur un résidu lysine d'une protéine SUMO (Small Ubiquitin-like Modifier) de 12 kDa. La sumoylation est antagoniste à l'ubiquitination, bien que les deux processus de modification soient très similaires. Il existe à ce jour quatre protéines SUMO distinctes identifiées (SUMO1, SUMO2 et SUMO3 qui sont ubiquitaires et présents chez tous les organismes et SUMO4 présente uniquement chez l'homme et exprimé uniquement dans certains organes tel que le rein ou la rate) (Johnson, 2004). Cette modification n'est pas directe mais nécessite une série de trois réactions enzymatiques. L'enzyme finale responsable de la sumoylation est appelée une SUMO ligase tandis que l'enzyme qui va lyser cette modification est une SUMO isopeptidase. Les fonctions de la sumoylation sont très diverses (K. A. Wilkinson & Henley, 2010). Pour exemple, la protéine RanGAP1 – facteur d'activation de la GTPase Ran impliquée dans la formation du noyau et du fuseau mitotique – doit être sumoylée pour interagir avec Nup358 (protéine des pores nucléaire). Cette interaction permet au complexe formé de cibler le fuseau mitotique et les kinétochores, où ils sont nécessaires pour assurer une bonne fixation des microtubules au kinétochore (Matunis et al., 1998).

1.2.4. La méthylation

La méthylation est une des modifications les plus complexes de la lysine. En effet, une lysine peut subir différents niveaux de méthylation mono- (Murray, 1964), di- (Paik & Kim, 1967) et tri-méthylation (Hempel et al., 1968). Elle consiste en l'ajout d'un

ou plusieurs groupements méthyl sur l'amine primaire ϵ de la lysine (Ambler & Rees, 1959; S. Kim & Paik, 1965; Paik & Kim, 1971). Bien que cette modification n'entraîne pas de modification de charge de la lysine, la méthylation permet quand même la modification de certaines interactions électrostatiques notamment dû à un encombrement stérique. La fonction des méthylations sur lysine dépend du niveau de méthylation (me1, me2, me3) et du résidu lysine méthylé au sein d'une protéine. Le groupement méthyl étant un groupement hydrophobe, la méthylation sur lysine va modifier la distribution des molécules d'eau dans le voisinage de la lysine modifiée. Les enzymes responsables de cette modification sont appelées des lysines méthyltransférases (KMTs) (Rea et al., 2000). Je reviendrai plus loin dans ce manuscrit sur ces enzymes et leurs modes d'action. La méthylation est une modification réversible, si bien qu'il existe des enzymes responsables de la déméthylation appelées lysines déméthylases (KDMs) (Paik & Kim, 1973).

1.3. Les modifications post-traductionnelles des histones

La structure de la chromatine joue un rôle majeur dans le contrôle de nombreux processus, tels que la transcription où l'accès à la chromatine est essentiel. Cette structure de la chromatine est notamment contrôlée et précisément régulée par les modifications post-traductionnelles que subissent principalement les queues N-terminales des histones nucléosomales (Bannister & Kouzarides, 2011) (**Figure 2**).

Dès le début des années 1960, les travaux de Vincent Allfrey ont mis en évidence que les histones subissent des modifications post-traductionnelles et plus précisément au niveau de leurs queues N-terminales (ALLFREY et al., 1964). Après quelques dizaines d'années sans réelles avancées dans le domaine, les avancées technologiques majeures (spectrométrie de masse, NGS pour Next-Generation Sequencing) des années 1990-2000 ont permis de faire des pas de géant dans le domaine. Ainsi, la découverte des différentes modifications d'histones a abouti dans un premier temps à la notion du « code des histones » initialement proposé par David Allis au début des années 2000, à l'instar du code génétique (Jenuwein & Allis, 2001). En effet, suite aux études des modifications des histones en corrélation avec l'expression de gènes, les chercheurs pensaient que, chaque modification possédait une fonction précise (comme H3K9ac est associée à une transcription active) et que

leur répartition et leur association permettait de décoder le niveau d'expression d'un gène.

Cependant, de nos jours, plus d'une centaine de modifications post-traductionnelles des histones différentes sont décrites et la notion du « code des histones » beaucoup trop simpliste n'est plus d'actualité (**Figure 2**). En effet, chaque modification est associée à un moment donné de la vie de la cellule ou à un contexte précis. Par exemple, la phosphorylation de la sérine 28 de l'histone H3 (H3S28ph) est à la fois associée à une chromatine compacte durant la mitose mais également associée à une transcription active en interphase (Gehani et al., 2010; Sawicka & Seiser, 2012). Les modifications post-traductionnelles des histones agissent en modifiant les propriétés de l'acide aminé modifié et/ou elles peuvent être « lues » par des protéines effectrices comme par exemple les enzymes capables d'établir ces modifications. Les modifications des histones peuvent ainsi réguler l'état et la structure de la chromatine lors de différents processus moléculaires tels que la transcription ou la réparation de l'ADN. Ces modifications influent les unes sur les autres d'une manière intra- ou inter-histones (Jenuwein & Allis, 2001).

L'histone subissant le plus de modifications post-traductionnelles connue à ce jour est l'histone H3. Les trois modifications post-traductionnelles de l'histone H3 les plus étudiées sont l'acétylation, la méthylation et la phosphorylation.

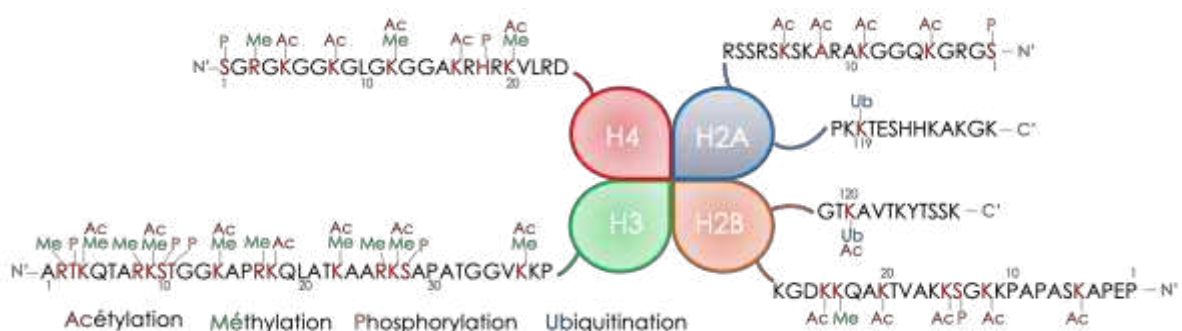


Figure 2 : Les principales modifications post-traductionnelles des queues N-terminales des histones.

Schéma d'un nucléosome représentant les différentes modifications post-traductionnelles des queues N-terminales des histones (Keppler & Archer, 2008).

1.3.1. La phosphorylation des histones

La phosphorylation a lieu sur les résidus Sérine (S), Thréonine (T) et Tyrosine (Y). Les enzymes responsables de la dynamique de phosphorylation des histones sont les kinases, qui lient les groupements phosphates aux acides aminés, et les phosphatases qui sont en charge de les enlever. La phosphorylation de la sérine 10 de l'histone H3 (H3S10), qui est très étudiée, est associée à une transcription active. Cette marque est régulièrement associée à l'acétylation de la lysine 9 de l'histone H3 (H3K9ac), permettant notamment l'expulsion de la protéine HP1 (Fischle et al., 2005) qui permet de garder la chromatine dans une forme compacte et défavorable à la transcription. De manière presque inattendue, H3S10 est enrichie sur les chromosomes mitotiques, qui pourtant sont dans une forme extrêmement compacte et où la transcription est inactive (Van Hooser et al., 1998).

Les phosphorylations sur les histones sont des marques activatrices de la transcription (en interphase) ou de la mitose, pouvant servir de point de contrôle pour la cellule. Par exemple, la phosphorylation de la thréonine 3 de l'histone H3 (H3T3P) est très finement régulée lors de la mitose. Cette marque est notamment reconnue par la sous unité Survivine du complexe CPC (Chromosome Passenger Complex) afin que ce dernier se fixe au centromère interne, permettant ainsi la progression mitotique nous développerons plus tard son rôle dans la deuxième partie de cette introduction (Dai et al., 2005; Kelly et al., 2010). Cette marque est très enrichie en début de mitose et disparaît lors de l'anaphase. Cette dynamique est un mécanisme de contrôle en début de mitose.

1.3.2. L'acétylation des histones

Bien que cette marque fût observée dans les années 1960 (ALLFREY et al., 1964), c'est seulement près de 30 ans après que la première histone acétyltransférase (HAT) est identifiée. Cette modification est associée à une activation de la transcription, en rendant la chromatine plus ouverte permettant un accès plus facile à l'ADN. L'acétylation des histones modifie la charge de ces dernières en neutralisant les charges positives des acides aminés modifiés ce qui a pour conséquence de

diminuer l'affinité pour les histones de l'ADN qui est chargé négativement (Kuo et al., 1998; C. A. Olsen, 2012; Tan et al., 2011). L'acétylation est réversible notamment par l'action d'histones désacétylases (HDACs). Les HATs et les HDACs sont souvent membres de complexes multiprotéiques dont les sous-unités peuvent notamment interagir avec des facteurs de transcription liés à l'ADN ou pour agir sur des promoteurs spécifiques. Désormais, depuis la découverte de substrats non histones comme par exemple la protéine 53BP1 (TP 53 binding protein) acétylée par CBP ce qui permet de réguler la voie de réparation des dommages à l'ADN (Grossman, 2001), les HATs et HDACs sont désormais appelées lysine acétylase (KAT) et lysine désacétylases (KDAC).

L'acétylation des histones joue également un rôle dans la progression du cycle cellulaire (par exemple l'acétylation des résidus lysines de l'histone H4 permet l'ouverture de l'ADN et ainsi sa réplication) (Grossman, 2001; Koprinarova et al., 2015), la recombinaison et la réparation de l'ADN (avec par exemple CBP qui acétyle l'histone H4) (Henry et al., 2013), mais également dans l'apoptose (Rajan et al., 2020).

1.3.3. L'ubiquitination des histones

Il y a très peu de lysines ubiquitinées connues sur les histones. Contrairement à la fonction la plus connue de l'ubiquitination des protéines, majoritairement associée à la dégradation des protéines par le protéasome, cette modification a un rôle tout autre au niveau des queues des histones H2A et H2B (Goldknopf et al., 1975; S. Matsui et al., 1979; West & Bonner, 1980). En effet, il s'agit d'une mono-ubiquitination qui agit sur la régulation de la transcription. En effet, la mono-ubiquitination de H2A (H2AK119ub) va entraîner l'inhibition de marques activatrices telle que H3K4me_{2/3} ou bien H3K27me₃ (R. Cao et al., 2005; Nakagawa et al., 2008; Wang et al., 2004). A l'inverse la mono-ubiquitination de H2B (H2BK120ub) favorise le dépôt des marques activatrices tels que H3K4me₃ (J. Kim et al., 2005; Nakagawa et al., 2008; B. Zhu et al., 2005). La mono-ubiquitination des histones est une marque associée à ce qu'on pourrait appeler une marque de « dialogue entre les histones » et elle est majoritairement reconnue par des lysine méthyltransférases comme Set1 ou le complexe polycomb (PRC2) (Wang et al., 2004; Worden & Wolberger, 2019).

1.3.4. La méthylation des histones

Le lien entre la méthylation des histones et la transcription est complexe car il est dépendant du résidu ainsi que du degré de méthylation. De plus, la position des nucléosomes modifiés au sein du gène est également importante (promoteur, corps du gène, TSS). On peut alors différencier deux rôles bien distincts, les méthylations associées à l'activation de la transcription et les méthylations associées à sa répression. Les enzymes en charge de ces modifications, les histones méthyltransférases (KMTs) et les déméthylases (KDMs), peuvent aussi bien être considérées comme co-activateurs ou co-répresseurs transcriptionnels en fonction des résidus étudiés (pour revue (Greer & Shi, 2012)). Nous développerons plus en détail le rôle de ces enzymes ainsi que leurs modes d'action plus loin dans ce manuscrit.

Pour conclure, le code des histones n'est plus vraiment d'actualité. Cependant, toutes ces modifications dites « marques épigénétiques » sont essentielles dans les rôles des protéines histones et modifient beaucoup leur comportement. Les modifications sur les protéines non histones découvertes plus récemment faites par ces enzymes que l'on a cru longtemps spécifiques des histones montrent que leurs rôles ne sont pas restreints à l'épigénétique, et rend beaucoup plus complexe l'étude de leurs fonctions cellulaires et la notion même d'épigénétique concernant leurs rôles.

2. LES ROLES DE LA METHYLATION DES LYSINES

La méthylation joue un rôle sur divers processus cellulaire et s'établit aussi bien sur l'ADN, l'ARN ou sur les protéines sur les acides aminées lysines, arginines ou histidines.

La méthylation de l'ADN est établie sur les cytosines. Elle peut modifier l'activité d'un segment d'ADN sans modifier la séquence. Lorsqu'elle est située dans un promoteur de gène, la méthylation de l'ADN agit généralement pour réprimer la transcription du gène. Chez les mammifères, la méthylation de l'ADN est essentielle au développement normal et est associée à un certain nombre de processus clés, notamment l'empreinte génomique, l'inactivation du chromosome X, la répression des éléments transposables, le vieillissement et la carcinogenèse.

Tout comme l'ADN, l'ARN messager (ARNm) peut être méthylé. Chez les mammifères, la modification la plus fréquente est l'addition d'un groupement méthyle en position 6 des résidus adénosine (m^6A), qui est observée sur environ 25 % des ARNm. La présence de cette modification, majoritairement près du codon stop et dans la région 3' non codante, participe au contrôle de la stabilité des ARNm et de l'efficacité de leur traduction. Il existe aussi une méthylation des cytosines de l'ARN en position 5 (m^5C). Les rôles biologiques de cette modification dans l'ARN, y compris l'exportation d'ARN, la traduction, l'ARN la fragmentation et la composition des ribosomes, ne sont pas encore pleinement identifiés.

Pour finir, les protéines peuvent également être méthylées sur les arginines, les histidines et les lysines. La méthylation de l'arginine est connue pour jouer un rôle majeur dans la régulation des gènes en raison de la capacité des PRMT à déposer des activateurs clés (histone H4R3me2a, H3R2me2s, H3R17me2a, H3R26me2a) ou des marques d'histones répressives (H3R2me2a, H3R8me2a, H3R8me2s, H4R3me2s). De plus, il existe de nombreux substrats non histones impliqués notamment la transcription, la signalisation cellulaire, la traduction de l'ARNm, la signalisation des dommages à l'ADN, la stabilité des protéines et l'épissage des ARN pré-messager (Blanc & phane Richard, 2017).

La méthylation des histidines est la moins étudiée des méthylations. Elle est impliquée dans de nombreux processus physiologique et cellulaire bien que les fonctions soit encore peu connue (Jakobsson, 2021).

Durant ma thèse, j'ai principalement étudié la méthylation sur lysine. Dans cette partie, je développe le rôle de la méthylation des lysines et les enzymes qui en sont responsables.

2.1. Généralités

La méthylation des lysines sur les protéines histones et non histones est générée par les lysines méthyltransférases (KMTs, appelées *writers*) et éliminée par les protéines lysine déméthylases (KDM, également appelées *erasers*), et comme abordé plus haut, les lysines méthylées sont également reconnues par des protéines effectrices appelées *readers*. À l'aide d'analyses prédictives, on prévoit qu'il y aurait plus de 100 KMTs chez l'humain, et certaines études basées sur la spectrométrie de masse indiquent qu'il y aurait plus de 1000 protéines possiblement méthylées sur lysines dans le protéome humain (S. P. Shi et al., 2012). On retrouve ces protéines dans toute la cellule (cytoplasme ou noyau) avec des fonctions très différentes. Par exemple le facteur de transcription E2F1 qui est mono-méthylé ce qui aura un impact sur sa stabilité (Kontaki & Talianidis, 2010) ou bien l' α -tubuline qui pourrait être mono ou di-méthylée bien que le rôle de cette modification reste inconnu (Kearns et al., 2021).

La méthylation de la lysine a été décrite pour la première fois en 1959 sur une protéine flagellaire bactérienne avant d'être identifiée sur des protéines histones en 1964 par K. Murray (Murray, 1964). En effet, les histones possèdent de nombreux résidus lysine, conservés au cours de l'évolution, qui sont méthylés *in vivo*. Chez l'homme, les principaux sites de méthylation de lysines sur les histones se trouvent sur l'histone H3 à la position 4 (H3K4), 9 (H3K9), 27 (H3K27), 36 (H3K36) et 79 (H3K79), et sur l'histone H4 sur la lysine 20 (H4K20) (Singh et al., 2010; Tan et al., 2011).

2.2. La lysine : une plateforme de modifications post-traductionnelles

Au sein des queues histones, la lysine est l'acide aminé le plus modifié. Il peut être méthylé, acétylé ou ubiquitinylé. Toutes ces modifications sont réversibles et permettent aux lysines des histones d'être au centre de la régulation de la transcription et de la dynamique de la chromatine (Tan et al., 2011). On distingue l'euchromatine,

qui correspond à la chromatine moins condensée où l'ADN est accessible et la transcription est permise, de l'hétérochromatine, qui correspond à une chromatine compacte où l'ADN est peu accessible (Jenuwein & Allis, 2001). Comme expliqué précédemment, l'acétylation des lysines est associée à une transcription active (euchromatine), alors que l'ubiquitination est, elle, plutôt associée à une répression transcriptionnelle (hétérochromatine) (pour revue (Grewal & Elgin, 2002; Sawan & Herceg, 2010)). La méthylation de son côté a un rôle plus complexe que les modifications précédentes. En effet, il n'y a pas une fonction définie pour la méthylation des histones mais un ensemble de fonctions qui dépend à la fois du niveau de méthylation du résidu lysine modifié mais également du résidu lui-même (Mosammaparast & Shi, 2010; Sims et al., 2003; Y. Zhang & Reinberg, 2001). Par exemple, la mono-méthylation de la lysine 9 de l'histone H3 (H3K9me1) est associée à l'euchromatine alors que la triméthylation de cette même lysine (H3K9me3) est, elle, associée à l'hétérochromatine (Mozzetta et al., 2015). D'un autre côté, la triméthylation de la lysine K4 de l'histone H3 (H3K4me3), que l'on retrouve dans l'euchromatine est plutôt associée à une transcription active (Eissenberg & Shilatifard, 2010).

La méthylation sur lysine n'est pas associée à un changement de charge. Elle ne va pas uniquement jouer sur un relâchement ou une compaction de la chromatine mais également sur l'interaction entre histones et protéines non histones. Il existe une catégorie de protéines que l'on appelle des « *readers* » qui sont capables de reconnaître les lysines méthylées (Sims et al., 2003; Wysocka, 2006) *via* différents domaines, comme le chromodomaine (Messmer et al., 1992), les domaines Tudor (Callebaut & Morinon, 1997; Ponting, 1997) et certaines répétitions ankyrines (Mosavi et al., 2004). Il existe un grand nombre de domaines impliqués dans la reconnaissance des lysines méthylées. Il s'agit d'une particularité de la méthylation sur lysine.

Parmi ces domaines, les chromodomaines par exemple sont des domaines impliqués dans la reconnaissance des lysines méthylées, notamment sur les queues des histones (Messmer et al., 1992). Par exemple, les protéines CHD (pour Chromo-ATPase/Hélicase-DNA-binding) régulent l'assemblage et la mobilisation des nucléosomes dépendant de l'ATP grâce à leurs doubles chromodomaines conservés et au domaine hélicase/ATPase SWI2/SNF2 (Thomä et al., 2005). On retrouve notamment CHD1 dans les *loci* enrichis en H3K4me3 (Dürr et al., 2006). D'autres

isoformes de CHD (CHD3/4 ou Mi-2) sont importantes pour le remodelage des nucléosomes dans les complexes d'histone désacétylases (Liu et al., 2011). Ces chromodomaines sont également retrouvés dans des protéines impliquées dans le maintien de l'hétérochromatine comme la protéine HP1 (Hétérochromatin Protein 1) (Nielsen et al., 2002) ou les complexes Polycomb (complexes permettant la triméthylation de H3K27 associée à l'extinction de la transcription) (Y. Guo et al., 2021). Ces protéines vont permettre le verrouillage de la chromatine en interagissant avec plusieurs nucléosomes, ce qui aura pour conséquence de bloquer la chromatine dans un état compact et donc non accessible à la machinerie de transcription.

La méthylation sur lysine permet également un dialogue avec d'autres modifications post-traductionnelles adjacentes. Un des mécanismes les mieux décrits est le *methyl/phospho switch*, qui est une transition méthylation de H3K9/phosphorylation de H3S10 (Fischle et al., 2005). En effet, la triméthylation de H3K9 permet la rétention de HP1 alors que la phosphorylation de la sérine adjacente (H3S10) induit le relargage de la protéine HP1 (**Figure 3**), permettant l'acétylation de H3K9, induisant une décondensation de la chromatine, ce qui rend l'ADN accessible et permet la transcription. Ces deux marques ne sont pas exclusives et c'est la phosphorylation de H3S10 qui va permettre le relargage de HP1.

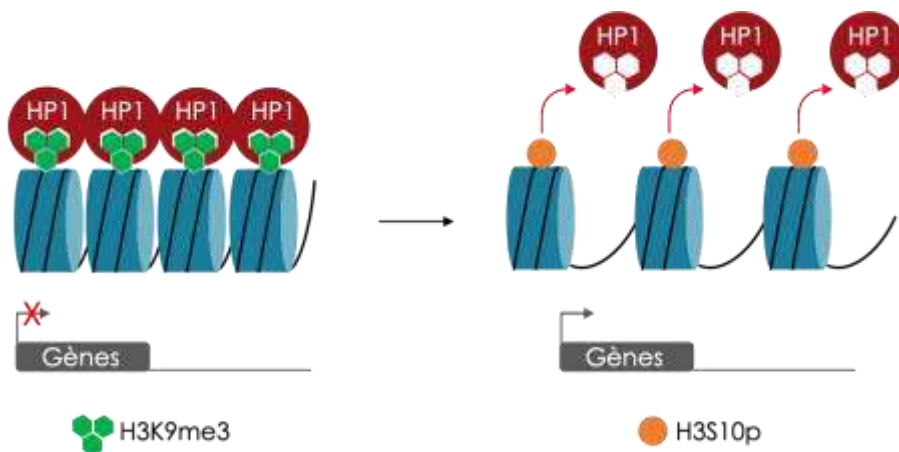


Figure 3: La transition méthyl/phospho sur H3K9 et H3S10.

Schéma explicatif du mécanisme de méthyl/phospho-switch. HP1 peut se fixer à H3K9me3 dans des zones d'hétérochromatine où la transcription est éteinte ou inactivée. Alors que la phosphorylation de H3S10 expulse la protéine HP1 de la chromatine et permet l'accessibilité à l'ADN par la machinerie de transcription.

La dernière catégorie de protéines capable de reconnaître les lysines méthylées sont les lysines méthyltransférases elles-mêmes. En effet, tous les niveaux de méthylation (me1, me2 et me3) ne sont pas nécessairement catalysés par les mêmes enzymes car toutes ne sont pas capables d'établir tous les niveaux de méthylation. Dans le chapitre suivant, nous reviendrons sur les enzymes qui régulent la méthylation des lysines en détail.

2.3. Les lysines méthyltransférases

2.3.1. Généralités

La méthylation de lysine sur les histones régule différentes fonctions de la chromatine, en fonction du niveau de méthylation et/ou du résidu méthylé (pour revue (Mozzetta et al., 2015)). Il existe plusieurs sites de méthylation de lysine sur les histones qui ne sont pas bien caractérisés (Tan et al., 2011). Et, à l'inverse, il existe également de nombreuses « histones méthyltransférases » dont les rôles sur les histones sont peu ou pas connus, bien que certaines d'entre elles aient des cibles non histones connues (discuté plus bas) (Li et al., 2020). Il existe également des méthyltransférases connues qui ne sont pas capable de méthyler les histones comme par exemple la protéine SMYD2. Certaines de ces enzymes n'ont également aucune activité méthyltransférase connue à ce jour comme la protéine SETDB2 (V. K. Rao et al., 2017; Torrano et al., 2019). Ensemble, le nombre important de sites de méthylation et les différents niveaux de méthylation possibles sur les histones montrent la complexité que ce système de signalisation aurait dans la régulation de la dynamique chromatinienne, et comment sa dérégulation peut entraîner de nombreuses maladies. Par exemple, on observe une dérégulation de nombreuses lysines méthyltransférases accompagnée de modifications globales de la méthylation des histones dans les cancers (V. K. Rao et al., 2017).

La découverte en 2000 de la première histone lysine méthyltransférase, SUV39H1, a permis une avancée majeure dans le domaine (Rea et al., 2000). Elle a

notamment permis de révéler un lien direct entre la méthylation sur lysine des histones et un mécanisme épigénétique connu chez la drosophile sous le nom de diversité à effet de position (Position-Effect Variegation, PEV) (Elgin & Reuter, 2013). Ce phénomène est en réalité un gène qui se retrouve au niveau de l'hétérochromatine suite à une transposition ou un réarrangement de la chromatine. Le gène en question est alors éteint dans la cellule alors qu'il devrait être activé. Il s'agit uniquement d'une modification de la position du gène au sein du noyau et non d'une modification du gène lui-même.

Pendant les 20 dernières années, la découverte et la caractérisation de nombreuses histones KMTs supplémentaires a permis la compréhension de mécanismes finement régulés reliant la chromatine, les processus épigénétiques et les maladies humaines. C'est tout naturellement que la majorité des recherches sur la méthylation de lysines s'est concentrée sur les substrats histones et leur rôle dans la régulation des processus chromatinien et des mécanismes épigénétiques.

L'émergence de ce domaine a orienté la caractérisation de cette nouvelle famille d'enzymes appelées, à tort, des « histones » lysines méthyltransférases. Les histones lysines méthyltransférases sont tout d'abord caractérisées par leur domaine catalytique, le domaine SET, qu'elles partagent toutes, sauf Dot1L qui ne présente pas de domaine SET (elle possède un domaine 7BS (seven- β -strand) qui est présent sur de nombreuses méthyltransférases de protéines non-histone (Falnes et al., 2016)) et qui méthyle H3K79 (Dillon et al., 2005; Feng et al., 2002). Ce domaine est appelé ainsi car il fut initialement identifié dans trois protéines de *Drosophila melanogaster* : Suppressor of Variagation 3-9 (Su(var)3-9), Enhancer-of-zeste (E(z)) et Trithorax (Trx). Le domaine SET permet la méthylation sur le groupement ϵ -amino de la lysine (Rea et al., 2000).

Pour finir, afin d'établir la méthylation sur lysine, les enzymes ont besoin d'un co-facteur, la S-adenosyl-L-Méthionine (SAM), qui est le donneur universel du groupement méthyl (Y. Zhang & Reinberg, 2001).

La classification de l'ensemble des KMT en familles de protéines se base sur les homologies de séquences autour du domaine SET. Ainsi, nous distinguons 6 familles de KMT à domaine SET (pour revue (Völkel & Angrand, 2007)):

- SUV39 (Su(var)3-9 homologues)
- EZH (E(z) homologues)
- SET1
- SET2
- PRDM (PR domain-containing)
- SMYD (SET and MYND domain-containing).

Comme évoqué précédemment, les méthylations sur histones ont donc des fonctions très différentes en fonction du résidu ciblé, du niveau de méthylation mais également en fonction de la région génomique subissant cette modification (voir **Tableau 1**). Pour la suite de ce manuscrit, nous allons nous concentrer sur la méthylation de H3K9 et plus précisément les enzymes responsables de cette marque.

2.3.2. Les lysines méthyltransférases spécifiques de H3K9

2.3.2.1. La méthylation de H3K9

Globalement, la méthylation de H3K9 est associée à la répression de l'expression des gènes, des rétrovirus et des séquences répétées. Cependant, dans certains cas, cette méthylation est associée aux gènes actifs. Par exemple, Vakoc et al. ont montré que la méthylation de H3K9 dans les régions transcrites de gènes actifs est associée à l'élongation de la transcription (Vakoc et al., 2005, 2006). Le niveau de méthylation de H3K9 va également jouer des rôles différents en fonction du domaine chromatinien où cette marque est apposée. En effet, H3K9 peut être mono-, di-, ou triméthylée et à ces différents niveaux de méthylation sont associées différentes réponses biologiques (Martin & Zhang, 2005). Par exemple, la mono- et la diméthylation de H3K9 sont présentes majoritairement dans l'euchromatine alors que la triméthylation de H3K9, principalement associée à la répression des rétrovirus et des séquences répétées, est, elle retrouvée au niveau de l'hétérochromatine (Bulut-Karslioglu et al., 2014). Cette triméthylation de H3K9 va, notamment, permettre la

fixation de la protéine HP1 *via* son chromodomaine, comme décrit plus haut (Hiragami & Festenstein, 2005).

Méthylation	État de la transcription	Région du génome
H3K4me1	Active	Promoteurs
H3K4me2		Enhancers
H3K4me3		Corps des gènes
H3K9me1		
H3K36me1		
H3K36me2		
H3K36me3		
H3K4me3	Prête	Promoteurs
H3K4me1		(ex : gènes du développement)
H3K27me3		
H3K9me3		
H3K27me3	Réprimée	Promoteurs
		Enhancers
		Régions riches en CpG
H3K9me3	Réprimée	Promoteurs
		Enhancers
H3K9me2	Réprimée	Promoteurs (ex : gènes neuraux)
H3K27me3		Centre de l'inactivation du X
H3K9me2	Réprimée	Régions répétées
H3K9me3		(ex : LTR ou régions péri-centromériques)

Tableau 1 : Récapitulatif des différentes méthylations sur l'histone H3.

Compilation des différentes marques de méthylation sur les histones, l'état de la transcription, fonctions ainsi que leur localisation sur le génome. L'état de transcription réprimée correspond à un état où la transcription est éteinte suite au programme de différenciation des cellules. (adapté de (Mozzetta et al., 2015))

Les KMTs principales de H3K9 sont les lysines méthyltransférases de la famille SUV39 : Suv39h1, Suv39h2, G9a, GLP, SETDB1 et SETDB2 (bien que cette dernière n'ait pas une activité méthyltransférase clairement prouvée à ce jour). Il existe cependant d'autres KMTs n'appartenant pas à cette famille, comme PRDM2/RIZ1, dont l'activité méthyltransférase sur H3K9 a été démontrée *in vitro* (K. C. Kim et al., 2003). De façon plus surprenante, il existe aussi des KMTs cytoplasmiques capables de mono méthylé H3K9 dans le cytoplasme comme PRDM3 et PRDM16 (Pinheiro et al., 2012). Nous ne développerons pas plus ces enzymes dans la suite de cette introduction.

2.3.2.2. La famille SUV39

La famille SUV39 comprend six membres ayant des actions différentes au sein de différents domaines chromatinien (Fritsch et al., 2010). On retrouve SUV39H1 et SUV39H2 deux protéines homologues à la protéine Su(var) de la drosophile, donnant son nom à cette famille (A. H. F. M. Peters et al., 2001). Elles sont enrichies principalement au niveau de l'hétérochromatine. G9A et GLP sont, elles, plutôt enrichies au niveau de l'euchromatine (Tachibana et al., 2008). Elles sont responsables de la mono- et la di-méthylation de H3K9. SETDB1 est la seule enzyme de cette famille à être capable d'établir les trois niveaux de méthylation (Seum et al., 2007). SETDB2 serait de son côté associée à la triméthylation de H3K9 (**Figure 4**).

Comme abordé dans le chapitre précédent toutes les enzymes de cette famille sont capables de lire (lier) les marques de méthylation déjà établies. Cependant, elles n'ont pas toutes le même domaine fonctionnel capable de cette lecture. SUV39H1 et SUV39H2 peuvent reconnaître les lysines méthylées à l'aide de leur chromodomaine. G9A et GLP présentent un domaine répété ankyrine essentiel dans les interactions protéine-protéine mais également dans la reconnaissance des marques H3K9me1 et H3K9me3 (**Figure 4**). De leur côté, SETDB1 et SETDB2 comportent un double domaine Tudor capable de reconnaître les lysines méthylées et permettant la fixation de SETDB1 à ces dernières (**Figure 4**). De plus, SETDB1 et SETDB2 ont la particularité d'avoir un domaine catalytique SET interrompu par une insertion de 347 acides aminés conservée des eucaryotes unicellulaires à l'humain qui leurs a donné

le nom (SET Domain Bifurcated). Ce domaine bien qu'interrompu conserve son activité catalytique. Ces enzymes peuvent agir dans un même complexe comme par exemple le complexe G9A/GLP/SUV39H1/SETDB1 (Fritsch et al., 2010). La dérégulation d'une des KMT de cette famille aura un impact sur l'ensemble des membres de cette famille.

Les quatre enzymes précédemment citées sont les enzymes principales de la famille SUV et les mieux décrites. L'ensemble de ces protéines ont des rôles variables au cours de la vie d'une cellule, pendant le cycle cellulaire ou lors de la différenciation des cellules. Nous développons ci-après leurs fonctions respectives plus précisément.

Au cours du cycle cellulaire, le niveau d'expression de SUV39H1 ne varie pas mais sa distribution sur la chromatine est régulée durant la mitose. En effet, SUV39H1 est relocalisée au niveau des zones centromériques pendant la mitose afin de permettre une compaction de l'hétérochromatine centromérique (A. H. F. M. Peters et al., 2001; Schotta et al., 2002). Cette compaction est essentielle pour une bonne ségrégation des chromosomes. Cette redistribution est notamment due à des modifications post-traductionnelles de SUV39H1 qui subit de nombreuses phosphorylations tout au long de la mitose (Czvitkovich et al., 2001; Petti et al., 2015). Cette dynamique de phosphorylation durant la mitose permet à SUV39H1 de jouer un rôle important lors de la division cellulaire. SUV39H1 est également une enzyme importante lors la différenciation cellulaire (Ait-Si-Ali et al., 2004; Guasconi et al., 2010). Bien qu'elle ne soit pas vitale, un knock-out (KO) unique de SUV39H1 chez la souris n'induit pas de phénotype particulier. Cependant, un double KO chez la souris de *Suv39h1* et *Suv39h2* se traduit par une diminution de la viabilité au cours du développement et induit de l'hypogonadisme et un échec de la spermatogénèse chez les souris mâles, ainsi qu'un retard de croissance chez certaines espèces (poisson zèbre), cela peut induire des défauts de différenciation terminale de certains organes ou tissus (Rai et al., 2006; Reimann et al., 2010). Cela est notamment dû à un défaut de réorganisation de la chromatine. En effet, SUV39H1 étant capable d'interagir avec DNMT3B (DNA Méthyltransférase 3B), le KO de SUV39H1 réduit considérablement la méthylation de l'ADN ainsi que celle de H3K9 de façon spécifique de tissu (Lehnertz et al., 2003; Snowden et al., 2002).

G9A et GLP (G9A-Like Protein) sont deux enzymes très similaires pouvant former des complexes homo- ou hétéro-dimériques ainsi qu'avoir des fonctions

indépendantes. Contrairement à SUV39H1, le niveau d'expression de G9A varie au cours du cycle cellulaire (Shankar et al., 2012). G9A est très fortement exprimée au cours des phases S et M. Cette expression, couplée à une relocalisation au niveau des fourches de réplifications, grâce à l'interaction avec PCNA (proliferating cell nuclear antigen) et DNMT1 (DNA méthyltransférase 1), permet la conservation de la méthylation de H3K9 dans l'hétérochromatine et de la méthylation de l'ADN (Estève et al., 2006; Tachibana et al., 2005, 2007). GLP est lui associé à la répression des gènes MYC et E2F lui conférant un rôle essentiel durant la phase G0 pour permettre la transition G0/G1 (H. Ogawa et al., 2002) (nous reviendrons plus en détail sur les phases du cycle cellulaire durant cette introduction).

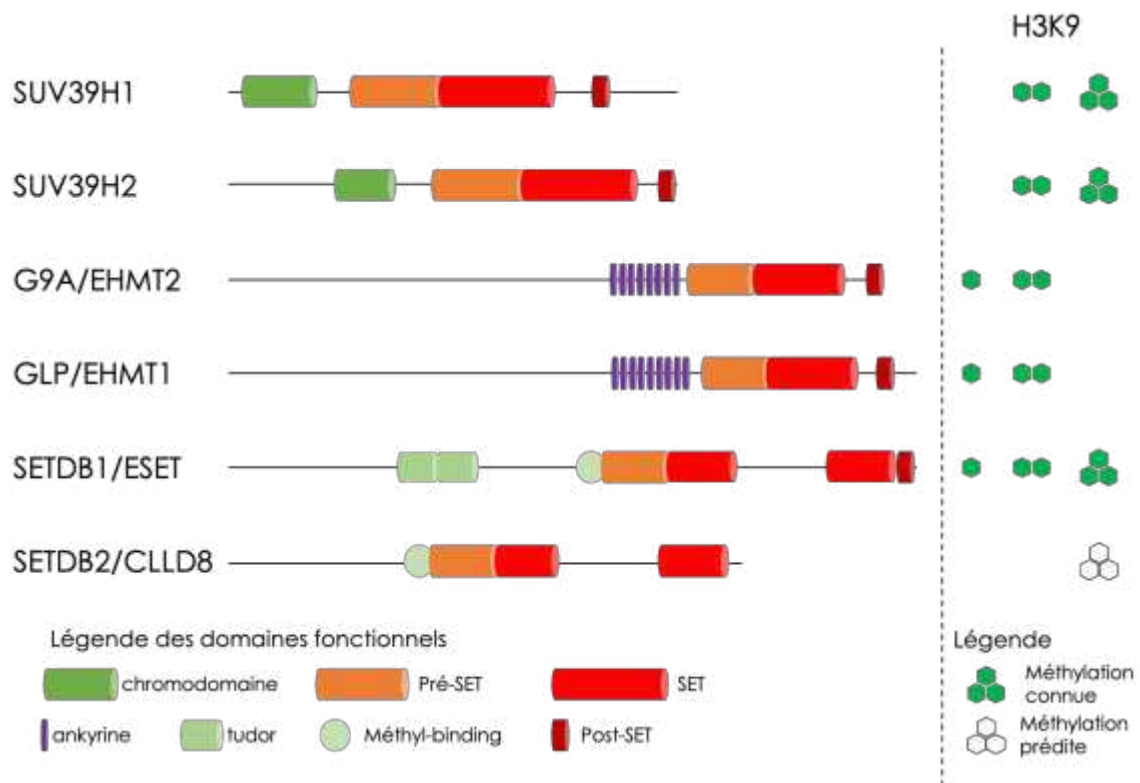


Figure 4 : Les méthyltransférases de la famille SUV39.

Présentation des lysines méthyltransférases de la famille SUV. Chaque protéine possède un domaine catalytique SET, entouré d'un domaine pré-SET et d'un domaine post-SET. Chaque membre possède un domaine de reconnaissance des lysines méthylées (Chromodomaine, Ankyrine et Tudor). SETDB1 et SETDB2 possèdent également un domaine putatif de reconnaissance de l'ADN méthylé. A droite est représenté le niveau de méthylation que ces enzymes sont capables d'établir. SETDB2 est la seule enzyme pour laquelle la fonction de lysine méthyltransférase n'a pas été clairement établie. L'hexagone vert correspond à un groupement méthyl (adapté de (Mozzetta et al., 2015)).

G9A et GLP sont des enzymes essentielles au cours développement embryonnaire et dans la différenciation cellulaire. Il a notamment été montré que les

simple KO de *G9a* ou *GLP* chez la souris, entraînent une létalité embryonnaire précoce à 9,5 jpc (jours post-coïtum) due à de sévères défauts de croissance et une perte globale de H3K9me1/2 au niveau de l'euchromatine (Stabell et al., 2006). Aussi, dans les cellules souches embryonnaires (ESCs), *G9a* est impliquée dans la répression irréversible du gène codant pour le marqueur de pluripotence Oct3/4 qui est réprimé rapidement et de façon stable dès les premières étapes de différenciation (Epsztejn-Litman et al., 2008; Feldman et al., 2006). De plus, la méthylation de H3K9 catalysée par *G9a* est impliquée dans l'inhibition de gènes régulés dans le développement, grâce à l'interaction entre *G9a* et des facteurs de transcription tissus spécifiques. Par exemple, *G9A* interagit dans les cellules du plasma (leucocytes) avec le facteur de transcription Blimp-1 (Gyory et al., 2004), dans le muscle avec le facteur myogénique MyoD (Ling et al., 2012), dans les neurones avec les facteurs de transcription neuronaux NRSF/REST et E2F6 (Roopra et al., 2004). Toutes ces protéines interagissent également avec *GLP*.

Les dernières enzymes de cette sous-famille sont SETDB1, dont les caractéristiques, les propriétés et les particularités seront décrites dans le prochain paragraphe, et SETDB2 qui est très peu connue à ce jour.

3. LA LYSINE METHYLTRANSFERASE SETDB1

3.1. Le rôle historique de SETDB1 : la (tri-)méthylation de H3K9, clé de la dynamique chromatinienne

SETDB1, également connue sous le nom de ESET (ERG-associated protein with SET domain) chez la souris, ou KMT1E, est impliquée dans la répression transcriptionnelle des gènes dans le compartiment de l'euchromatine. Elle a été identifiée en 2002 grâce à son interaction avec la protéine ERG (ETS-Related Gene protein) dans un criblage double-hybride chez la levure. Initialement, elle a d'abord été décrite comme une protéine localisée au niveau de l'euchromatine exerçant son action sur l'inhibition de la transcription. Cette action est permise par son interaction avec

KAP1, un corépresseur qui interagit avec les protéines KRAB (Krüppel Associated Box) à doigt de zinc qui permet son recrutement au niveau des promoteurs des gènes (Schultz et al., 2002). L'étude de SETDB1 a permis de mettre en évidence qu'elle est capable d'interagir avec un grands nombres protéines, comme des facteurs de transcription (ERG), des HDAC (HDAC1/2), des ADN méthyltransférases (DNMT3A/B) ou bien des corépresseurs transcriptionnels, tels que mSin3A/B, MBD1, KAP1 et mAM. SETDB1 seule est capable de mono- et de di-méthyle H3K9 (Seum et al., 2007), mais également de tri-méthyle H3K9 en présence de son cofacteur ATF7IP (Activating transcription factor 7-interacting protein 1, également appelé MCAF ou AM, mAM chez la souris et hAM chez l'Homme) (Wang et al., 2003).

SETDB1 agit au niveau de l'euchromatine où elle est essentielle dans la répression des gènes. SETDB1 agit également au niveau des péri-centromères, où elle permet l'établissement et le maintien de l'hétérochromatine. Pendant la réplication, SETDB1 peut interagir avec HP1 et la protéine Chromatin Assembly Factor 1 (CAF1). C'est avec ces partenaires que SETDB1 mono-méthyle H3K9 sur l'histone H3 soluble, ce qui permettra par la suite le recrutement, et l'incorporation de H3 dans l'ADN des régions péri-centromériques néo-répliquées et leur triméthylation par SUV39H (Loyola et al., 2009).

Chez la souris, SETDB1, appelée ESET, est essentielle dans le développement embryonnaire et dans la viabilité des cellules mESCs. Une perte de fonction homozygote du gène *Eset* aura pour conséquence une létalité de l'embryon entre 3,5 et 5,5 jpc. SETDB1 est en fait cruciale pour le maintien de la pluripotence des mESCs et son absence entraîne une différenciation des cellules ESCs en trophoblaste (Bilodeau et al., 2009; Dodge et al., 2004). Ce rôle de ESET est notamment dû à son action sur les ERV (Endogenous RetroVirus). En effet, ESET est exprimée à un niveau élevé dans les ovocytes et les embryons avant implantation. Elle est essentielle dans le dépôt de H3K9me3 au niveau des rétroéléments MLV (Murine Leukemia Virus) (Pasquarella et al., 2016), IAP (Intracisternal A particules) ou MusD (Mus type-D related) (Deniz et al., 2018). ESET a donc un rôle crucial dans l'inhibition des ERVs au cours du développement, en particulier dû au fait que la méthylation de l'ADN est en cours de reprogrammation (T. Matsui et al., 2010).

Les fonctions de SETDB1 en tant que régulateur du développement ne se limitent pas aux cellules ES. SETDB1 est impliquée dans l'extinction des gènes non neuronaux dans les cellules progénitrices neurales et l'ablation de SETDB1 altère la neurogenèse précoce et entraîne ainsi de graves anomalies du développement cérébral (Fei, Yang, et al., 2015). SETDB1 joue un rôle central dans la spécification de la lignée des cellules souches mésenchymateuses. L'activation de SETDB1 par la signalisation Wnt non canonique inhibe PPAR γ (récepteur nucléaire), entraînant la différenciation des cellules souches mésenchymateuses en lignée ostéoblastique (Takada et al., 2010). De plus, la suppression conditionnelle de SETDB1 dans les cellules mésenchymateuses a révélé que SETDB1 est nécessaire à la différenciation hypertrophique des chondrocytes (cartilage) (Yahiro et al., 2017). SETDB1 est également essentielle dans la différenciation myogénique des myoblastes en maintenant l'expression de MyoD (facteur de transcription myogénique) (Song et al., 2015). Mon laboratoire d'accueil a également montré que SETDB1 était relocalisé au niveau du cytoplasme lors de la différenciation musculaire suite à l'activation de la voie Wnt/ β caténine (Beyer et al., 2016).

De plus, il fut récemment montré que SETDB1 pouvait jouer un rôle à travers la méthylation de H3K9 sur la réorganisation de la structure 3D du génome dans des cellules neurales (Jiang et al., 2017). En effet, il existe de larges domaines dans le génome qui sont regroupés géographiquement dans le noyau. On appelle ces domaines des TAD (Topologically Associated Domains). Ces domaines sont régulés notamment par la protéine CTCF (CCCTC-binding Factor) et le complexe cohésine qui vont permettre de les délimiter (Merkenschlager & Nora, 2016). Dans le développement du cerveau, il existe un groupe de gènes qui est essentiel dans de nombreux processus de développement neurale que l'on appelle les gènes protocadhérine. Ces gènes sont régulés grâce à leur regroupement en TAD (Corces, 2014; S. S. P. Rao et al., 2014). SETDB1 joue un rôle essentiel dans la régulation de ces TADs grâce à son action sur H3K9. La tri-méthylation de H3K9 par SETDB1 permet de bloquer l'hyper-acétylation des histones et de maintenir l'ADN méthylé qui va alors favoriser la reconnaissance de ces sites d'ADN méthylé par CTCF (qui possèdent des domaines à doigt de zinc) qui permettra alors la régulation des TAD de gène *Protocadhérine*. Cela indique l'importance de SETDB1 dans le développement

neural et en particulier dans la différenciation des cellules souches neurales (Jiang et al., 2017).

SETDB1 possède un domaine permettant une potentielle fixation à l'ADN méthylé – bien que cette fixation n'ait jamais été démontrée –, et un domaine Tudor qui permet une reconnaissance des résidus arginine et lysine méthylés régulant ainsi ses interactions protéine-protéine (Figure 5A). Ces deux domaines permettraient donc à SETDB1 d'être acteur dans la coordination entre la méthylation des histones et de l'ADN. SETDB1 a également la particularité de posséder deux signaux putatifs d'export nucléaire (NES) en plus de ses deux signaux de localisation nucléaire (NLS) (Figure 5A) (Cho et al., 2013). Il est d'ailleurs démontré que SETDB1 est bien présente dans le cytoplasme. En effet, elle semble jouer un rôle au sein du cytoplasme et notre laboratoire a d'ailleurs pu mettre en évidence qu'il existe une importante relocalisation de cette enzyme dans le cytoplasme lors de la différenciation musculaire terminale (Figure 5B) (Beyer et al., 2016). Cette étude a pu également aboutir à la mise en évidence que SETDB1 cytoplasmique est tout à fait fonctionnelle dans des tests *in vitro* (non publié). Cela pose de nouvelles questions quant aux rôles de cet enzyme et ouvre la voie à de nouvelles études de cette protéine.

En dehors de son rôle historique de méthylation de H3K9, il a été découvert que SETDB1 possède des cibles non histones lui conférant des propriétés de plus en plus importantes pour la vie de la cellule.

3.2. Les cibles non histone de SETDB1

3.2.1. La méthylation de UBF

C'est en 2014 que pour la première fois des études ont montré que SETDB1 était capable de méthyler des protéines non histones. La première cible à avoir été découverte est la protéine UBF (Upstream Binding Factor), un facteur de transcription essentiel dans le maintien de la transcription de l'ADN ribosomal (ADNr) (Hwang et al., 2014). A lui seul, le recrutement de UBF au niveau de l'hétérochromatine est capable d'induire une décondensation de la chromatine à grande échelle. UBF est

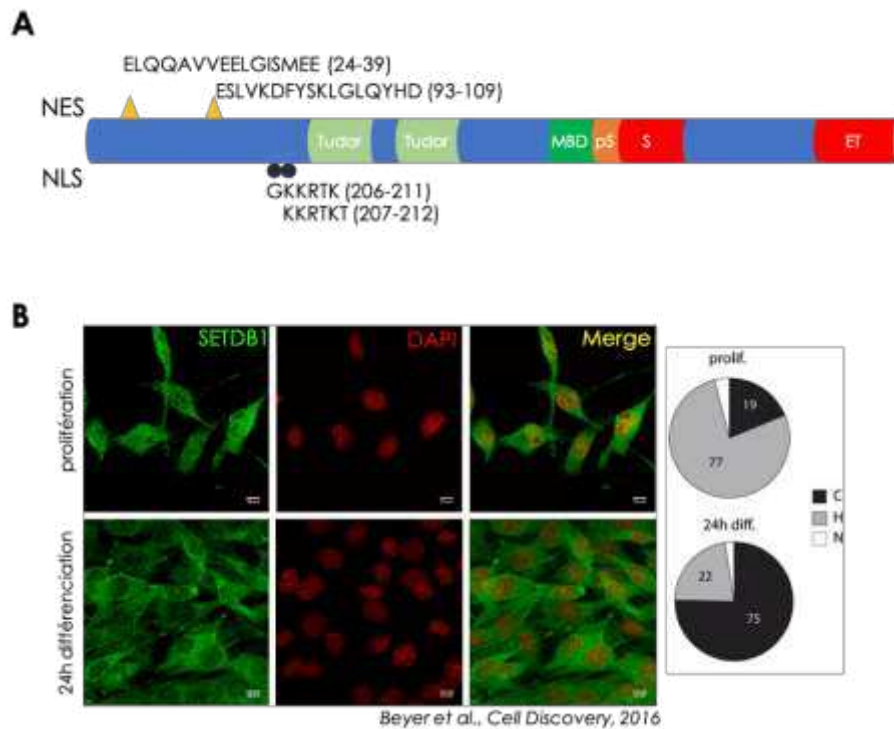


Figure 5 : Caractéristiques de SETDB1 et localisation subcellulaire.

A. Schéma représentant les différents domaines fonctionnels de SETDB1 (murin). SETDB1 possède un site catalytique scindé en deux. Elle possède également des sites putatifs d'adressage : NLS (Nuclear Localization Signal) et NES (Nuclear Export Signal). B. Immunofluorescence contre SETDB1 (vert) dans des cellules C2C12 (myoblastes murins) en prolifération montrant SETDB1 majoritairement homogène dans la cellule (panneaux du haut) et qui est relocalisé au niveau du cytoplasme (panneaux du bas) après différenciation (rouge, DAPI). Les quantifications du signal de fluorescence en fonction du compartiment cellulaire sont montrées sur les diagrammes à droite.

connu pour être finement régulé par des modifications post-traductionnelles, telles que la phosphorylation ou l'acétylation. Une des principales lysine acétyltransférases de UBF est CBP (Pelletier et al., 2000). L'acétylation de UBF par CBP est liée à l'activation de la transcription de l'ADNr. C'est ainsi que dans la maladie de Huntington (maladie due à une mutation dans le gène codant pour la Huntingtine), l'altération de ce mécanisme influence le remodelage de la chromatine et induit une dérégulation de la transcription, ce qui conduit à une neuro-dégénérescence. En effet, le mutant de la Huntingtine va alors séquestrer CBP qui ne pourra pas activer UBF, ce qui aura comme effet de bloquer la transcription des ARNr (J. Lee et al., 2011; Junghee Lee et al., 2014). SETDB1 est surexprimée dans la maladie de Huntington et cela impacte directement le niveau de H3K9me3. Cela a comme effet une dérégulation de la transcription ainsi qu'une neuro-dégénérescence. Une étude visant à montrer l'impact

que pouvait avoir SETDB1 sur les modifications épigénétiques de l'ADNr dans la maladie de Huntington a mis en évidence une interaction entre UBF et SETDB1. De façon intéressante, cette interaction donne lieu à une triméthylation de UBF par SETDB1 sur deux lysines (K232 et K254). Cette méthylation bloque l'activité sur la transcription de l'ADNr de la protéine UBF (Junghee Lee et al., 2014). De façon intéressante, il a par ailleurs été montré qu'un inhibiteur de SETDB1, APQ (5-allyloxy-2-(pyrrolidin-1-yl)quinoline) permet de bloquer l'activité méthyltransférase de SETDB1 mais également de diminuer son expression. Cela permet, de diminuer le niveau global de H3K9me3 et de restaurer les fonctions motrices chez les modèles de souris HD (Huntington Disease) en rééquilibrant l'expression des gènes (Hwang et al., 2021). Il serait d'ailleurs intéressant de vérifier si cette amélioration passe aussi par le blocage de la méthylation de UBF.

3.2.2. La méthylation de p53

Dans une cellule au repos, la protéine p53 normale est maintenue à un très faible niveau. En cas de stress cellulaire, tels que des dommages à l'ADN ou des conditions hypoxiques, p53 est rapidement activée puis stabilisée. P53 est décrite comme une protéine présentant des fonctions anticancéreuses et est inhibée (mutée et inactivée) dans plus de 50% des cancers humains. Cependant, certaines mutations de P53 comme la mutation R249S, lui confère des propriétés oncogéniques. Ces mutants sont appelés GOF (*Gain Of Function*) p53. L'expression de ces mutants contribue à une transcription aberrante, une instabilité génomique, une activité anti-apoptose et amplifie la progression tumorale en améliorant l'invasion des cellules tumorales et leur migration (Brosh & Rotter, 2009; Hsu et al., 1991).

L'activité de p53 est régulée par diverses modifications post-traductionnelles, notamment la phosphorylation, l'acétylation, l'ubiquitination et la méthylation. Récemment, plusieurs KMTs et (KDMs) telles que SET7 (Kurash et al., 2008), SMYD2 (J. Huang et al., 2006), SET8 (X. Shi et al., 2007), G9A (J. Huang et al., 2010) et LSD1 (J. Huang et al., 2007) ont été décrites pour moduler le statut de méthylation de p53 sur des motifs distincts .

Dans le cancer du foie, on observe à la fois une surexpression de SETDB1 et une expression d'une protéine mutante GOF p53. Fei et al., ont pu mettre en évidence que SETDB1 est capable de di-méthyle la lysine K370^{me1} de p53 augmentant ainsi sa stabilité (uniquement ce mutant). En parallèle, ils ont pu montrer que SETDB1 a une plus forte affinité pour le mutant GOF de p53 que pour la protéine normale. Ainsi, SETDB1 va alors méthyle préférentiellement le mutant GOF de p53 dans le cancer du foie (Fei, Shang, et al., 2015). Dans ce contexte, la diminution de l'expression de SETDB1, surexprimée dans ce cancer, réduit drastiquement la méthylation de K370 de GOF p53, ce qui augmente fortement la reconnaissance de cette dernière par MDM2, une ubiquitine ligase, qui aura pour conséquence une dégradation de la protéine GOF p53 (Fei, Shang, et al., 2015). Cela pourrait donc permettre à SETDB1 d'être une bonne cible thérapeutique dans les cancers du foie.

3.2.3. La méthylation de AKT

En 2019, pour la première fois, il fut montré que SETDB1 possédait des cibles non histones cytoplasmiques. La première cible découverte fut la protéine AKT (autrement appelé protéine kinase B, PKB), une kinase ayant de nombreux rôles cellulaires avec notamment un rôle important dans la voie de signalisation de la survie cellulaire. La signalisation PI3K/AKT est un mécanisme fondamental dans la prolifération cellulaire, la survie et son hyper-activation est associée à divers cancers. Au sein de la cellule, les facteurs de croissance stimulent la cellule permettant notamment l'activation de la voie AKT, dans laquelle la protéine AKT va phosphoryler un grand nombre de protéines impliquées dans la transduction du signal par cascades de phosphorylation (Brotelle & Bay, 2016). Il est notamment connu que AKT est régulée par TRAF6/Skp2 (une ubiquitine ligase) à travers une ubiquitination de AKT.

Guo et al ont mis en évidence que la triméthylation des lysines K140 et K142 de AKT1 est catalysée par SETDB1. Biologiquement, l'absence de méthylation de AKT1 réduit son activité kinase, réprime la croissance cellulaire, l'absorption de glucose et la tumorigenèse. En conséquence, un déficit en méthylation de AKT dépendant de la déplétion de SETDB1 (par shARN) peut diminuer physiologiquement la taille du corps de la souris et peut protéger les souris contre le développement de

tumeurs cutanées induites par des cancérigènes. L'utilisation d'inhibiteurs de SETDB1 donne des résultats similaires (J. Guo et al., 2019).

Ce nouveau substrat renforce le fait que SETDB1 pourrait être une bonne cible thérapeutique dans de nombreux cancers.

3.3. SETDB1 est une enzyme clé dans de nombreux cancers

Tous les membres de la famille SUV39 sont dérégulés dans le cancer. En particulier, la surexpression de SETDB1 est une caractéristique favorisant la tumorigenèse, commune à différents cancers, tels que les cancers du poumon (Rodriguez-Paredes et al., 2014), du sein (Batham et al., 2019), du mélanome (Ceol et al., 2011b), du foie (Fei, Shang, et al., 2015) et du côlon, (**Figure 6**). Par exemple, SETDB1 joue un rôle crucial dans le cancer colorectal (CCR) où sa surexpression est associée à un faible taux de survie des patients. De plus, SETDB1 est impliquée dans les CCR humain via l'activation de la signalisation Wnt, une voie aussi associée à d'autres types de cancer, notamment les cancers du sein, de la prostate et du poumon (N. Cao et al., 2020). SETDB1 est surexprimée et responsable de l'évasion immunitaire dans la leucémie aiguë myéloïde : elle est importante pour la suppression/répression des éléments transposables (TE), qui inhibent la réponse antivirale IFN de type I. L'inhibition de SETDB1 dans la leucémie aiguë myéloïde contribue à la réexpression des TE conduisant à l'apoptose dépendante de IFN. En effet, dans de nombreux cancers humain, SETDB1 est surexprimée et est même considéré comme oncogène primaire. Ce rôle est notamment associé à la répression de l'expression de TE qui sont étroitement liés à la régulation des gènes responsables dans la réponse immunitaire (Cuellar et al., 2017). Cela va donc empêcher une réponse normale du système immunitaire qui aurait dû cibler les cellules tumorales. Cela permet de définir SETDB1 comme une bonne cible en thérapie pour pouvoir réenclencher le système immunitaire.

SETDB1 est également responsable de l'augmentation du taux de prolifération du cancer au cours d'un traitement médicamenteux anticancéreux, comme la 3-déazaneplanocine A ou le Taxol, par la répression de l'élément répété intercalé 1

(LINE-1) et la régulation du gène *FosB*, associé à la cellule prolifération (Strepkos et al., 2021).

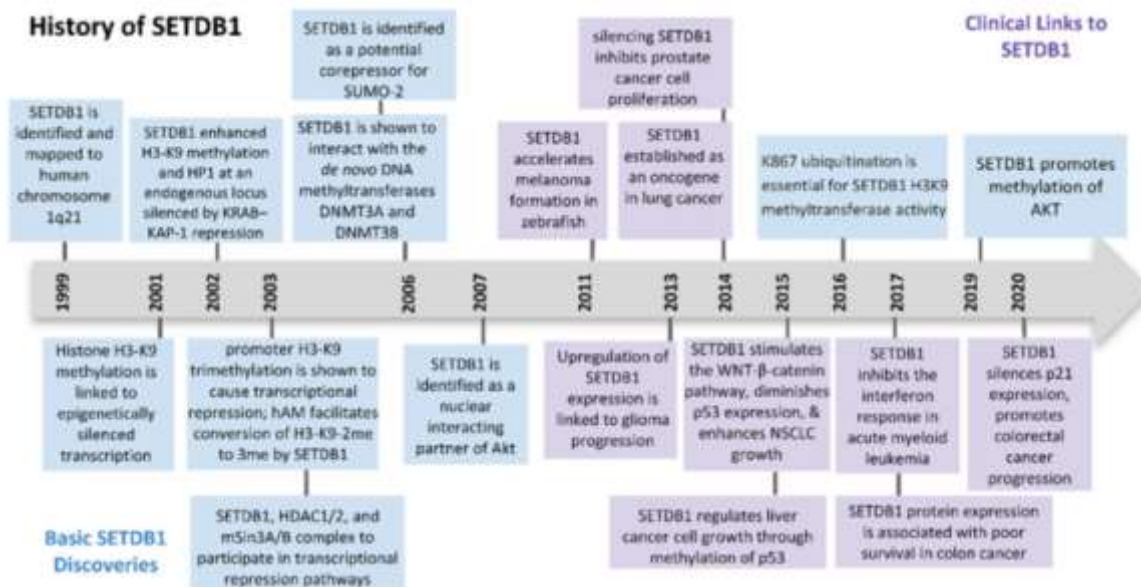


Figure 6 : Découvertes majeures à propos de SETDB1 au cours du temps.

Chronologie des découvertes sur SETDB1, de sa caractérisation à son action clinique (Lazaro-Camp et al., 2021).

SETDB1 catalyse toutes les formes de méthylation de H3K9 mais principalement la di- et la tri-méthylation, favorisant la répression transcriptionnelle. Ce processus affecte la progression du cancer par l'inactivation épigénétique des gènes suppresseurs de tumeurs et comme expliqué plus tôt par l'inhibition des TE responsables de la régulation de la réponse immunitaire (Cuellar et al., 2017). L'activité de SETDB1 résultera également dans la dérégulation des voies de signalisation contrôlant la prolifération, la migration et l'invasion cellulaire (Yuqin Zhang et al., 2018). De plus, SETDB1 a été récemment impliquée dans la régulation de l'organisation 3D du génome : il est nécessaire pour protéger le génome d'une liaison excessive du CTCF (facteur de répression de la transcription liant les motifs CCCTC) et contribue ainsi au maintien structurel des domaines de chromatine à grande échelle (Jiang et al., 2017).

Au-delà des histones, tous les membres de la famille SUV39 méthylent de nombreux substrats non histones, dont UBF, p53, DNMT1, HP1 et p63, qui sont impliqués dans la tumorigenèse (X. Zhang et al., 2012). Par exemple, il a été montré

que SETDB1 est responsable de la croissance des cellules cancéreuses du foie via la méthylation de GOF p53, ce qui augmente la stabilité de GOF p53 et donc son rôle oncogène (discuté plus haut) (Fei, Shang, et al., 2015). Dans le cancer du sein, l'interaction entre SETDB1 et p63 (protéine tumorale de la famille de p53) est essentielle pour la stabilité de p63, ce qui favorise la tumorigenèse (Regina et al., 2016). Enfin, il a été montré que SETDB1 méthyle la kinase AKT, ce qui favorise son activité kinase et ses fonctions oncogènes (J. Guo et al., 2019).

La régulation à la baisse de SETDB1 réduit la croissance des cellules cancéreuses *in vitro* (Rodriguez-Paredes et al., 2014). Ces dernières années, différents traitements anticancéreux modulant des cibles épigénétiques (épidrogues) ont été testés jusqu'en stade clinique (non commercialisés), dont les inhibiteurs d'histone désacétylases. SETDB1 pourrait alors être une cible thérapeutique potentielle dans les cancers induits par AKT (J. Guo et al., 2019). Enfin, l'amplification du gène *SETDB1* est une caractéristique courante du cancer du poumon. Pour évaluer l'expression de SETDB1 et les caractéristiques clinico-pathologiques des patients atteints d'un cancer du poumon, notre groupe a effectué une méta-analyse de données transcriptomiques et a trouvé des niveaux statistiquement plus élevés d'ARNm *SETDB1* dans les tissus cancéreux par rapport aux témoins non cancéreux et montré que la surexpression de SETDB1 est associée à un mauvais pronostic clinique (Cruz-Tapias et al., 2019b). Nos résultats suggèrent que les niveaux d'expression de SETDB1 pourraient être utilisés comme biomarqueur diagnostique et/ou potentiellement comme cible thérapeutique dans le cancer du poumon. De plus, des études dans notre groupe montrent que l'inhibition de SETDB1 dans les cellules cancéreuses du poumon inverse le phénotype tumorigène *in vitro* et *in vivo* (Zakharova et al., 2022).

Contrairement aux autres KMTs de H3K9, qui ne présentent qu'une localisation nucléaire, SETDB1 est principalement localisée dans le cytoplasme de plusieurs types cellulaires, notamment les mESC, les MEF et les cellules cancéreuses (HeLa et HepG2, non publié). Notre laboratoire a récemment montré que, bien que SETDB1 soit nucléaire et cytoplasmique dans les myoblastes indifférenciés, elle est fortement enrichie dans le cytoplasme lors de la différenciation terminale du muscle squelettique de manière dépendante de la signalisation Wnt, une voie notamment

associée à la tumorigenèse (Beyer et al., 2016). Cependant, la signification de la localisation cytoplasmique de SETDB1 reste en général encore incomprise.

Durant mes travaux de thèse, j'ai pu identifier que SETDB1 pourrait également être impliquée dans la régulation de la progression mitotique grâce à la méthylation d'une protéine non-histone, directement impliquée dans la mitose. Je vais donc vous introduire dans la partie suivante certaines notions concernant la régulation de la progression mitotique.

PARTIE 2 : LE COMPLEXE CPC ET LA MITOSE

1. LA MITOSE

1.1. Le cycle cellulaire

Le cycle cellulaire eucaryote se divise en quatre phases très précisément régulées, que sont les phases : G1, S, G2 et M. L'ensemble des phases G1, S et G2 constitue l'interphase tandis que la phase M est la phase de mitose qui sera détaillée tout au long de ce chapitre.

Afin que la division cellulaire se passe correctement, et pour transmettre l'ensemble de son matériel génétique, la cellule mère a besoin d'augmenter sa quantité de protéines et d'organites mais également doubler sa quantité d'ADN. La phase S (phase de synthèse de l'ADN) correspond à la phase pendant laquelle la cellule va répliquer l'ensemble de son ADN. Les phases G1 et G2 (G pour Gap) sont des phases permettant de laisser du temps à la cellule pour produire tout le matériel nécessaire à l'étape suivante. Ces deux phases permettent également à la cellule de surveiller son environnement (interne et externe). Les phases M et S sont les deux phases les plus sensibles pour la cellule et la préparation de la cellule est cruciale pour éviter des catastrophes.

Plus en détail, la phase G1 est une phase essentielle au début du cycle et avant la phase S où la cellule est particulièrement sensible aux conditions du milieu extérieur et aux signaux transmis par les cellules voisines. Cette phase varie en longueur en fonction de ces différents paramètres. Si la cellule considère que les signaux ne sont pas favorables, la cellule peut entrer dans une phase de pause dans son cycle nommée G0 (ou phase de quiescence). Un des exemples connus de cet arrêt du cycle est l'inhibition par contact, où, les cellules confluentes en culture, arrêtent de se diviser (Israels & Israels, 2000).

Les protéines majeures dans la régulation temporelle du cycle cellulaire sont les cyclines et les Cdk (Cyclin dependent kinase). Les Cdk étant des kinases, elles sont considérées comme des protéines motrices du cycle cellulaire. Les cyclines sont des protéines régulatrices des Cdk. Les combinaisons des complexes Cycline-Cdk déterminent les phases du cycle à activer en ciblant les protéines nécessaires pour les différentes transitions (Grana & Reddy, 1995). Nous reviendrons dans le chapitre suivant plus en détail sur ces complexes de régulation.

La dernière phase du cycle cellulaire est la mitose. Elle-même est décomposée en quatre sous phases bien différenciées (**Figure 7**). Au début de la mitose, on retrouve la prophase, qui correspond à la condensation des chromosomes ainsi qu'à l'organisation des microtubules en fuseaux mitotiques. Pendant cette étape, les deux centres d'organisation des microtubule (COMT, aussi appelés centrosomes) se dirigent aux deux pôles opposés de la cellule. Entre la prophase et la prochaine étape, il existe une phase de transition appelé prométaphase. Après la décomposition de l'enveloppe nucléaire (NEB, *Nuclear envelope Breakdown*), les chromosomes se lient grâce à leurs kinétochores aux fuseaux de microtubules (aussi appelé fuseaux mitotiques). Cela permet l'alignement des chromosomes au centre de la cellule en division. Lorsque l'équilibre complet est atteint la cellule est alors en métaphase.

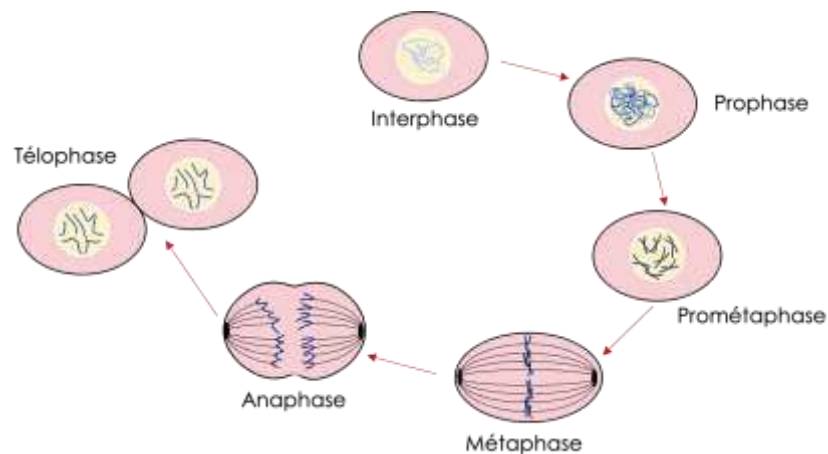


Figure 7 : Représentation des différentes phases de la mitose.

La mitose se compose de 4 phases. Avant la mitose la cellule est en interphase. Elle va ensuite entrer en mitose en commençant la condensation de ses chromosomes en prophase. Une fois la condensation des chromosomes terminée, elle entre dans la phase de transition qui est la prométaphase. Ensuite, durant la métaphase, les chromosomes s'alignent au centre de la cellule en division. Une fois cet alignement correct, on assiste à la séparation des chromatides sœurs durant l'anaphase pour terminer en téléphase par la reformation de l'enveloppe nucléaire autour des chromatides sœurs séparées.

Après de nombreux points de contrôles, l'anaphase commence. Durant cette phase, les microtubules séparent les chromatides sœurs en les tirant vers les deux pôles de la cellule. Enfin, lorsque les chromatides sœurs sont bien séparées, une enveloppe nucléaire se reforme autour de ces dernières pendant la télophase. La division cellulaire s'achève par la séparation en deux cellules grâce à un anneau d'actomyosine au centre de la cellule en division donnant naissance à deux cellules filles identiques. Ces deux cellules restent liées par un ensemble de microtubules durant la cytokinèse (King et al., 1994).

2. REGULATION DE LA MITOSE

2.1. Les complexes Cycline/CDK

C'est en 1988 que le facteur universel MPF (pour M-phase Promoting Factor), qui contrôle l'entrée en mitose des cellules eucaryotes, a été identifié comme étant un complexe kinase hétérodimérique constitué d'une sous-unité catalytique, p34CDC2, et d'une sous-unité régulatrice, la cycline B. Plusieurs équipes furent à l'origine de cette découverte comme celles de James Maller à Denver (CO, USA) (Gautier et al., 1988) et celle de Marcel Dorée à Montpellier (Picard et al., 1988). C'est depuis cette découverte que l'ensemble des transitions du cycle cellulaire sont apparues comme étant contrôlées par ces complexes. Ces complexes se caractérisent par l'association d'un membre d'une famille de sérine/thréonine kinases, les CDK et d'un de leurs partenaires cyclines respectifs.

Le rôle ainsi que leurs actions dans le cycle ne sont pas complètement caractérisés pour l'ensemble des différents complexes CDK-Cyclines. Pour autant, la formation d'un complexe Cycline-CDK spécifique à des étapes précises est essentielle pour la progression tout au long du cycle cellulaire et pour le passage des différents points de contrôle de ce dernier (**Figure 8, 9A**).

Tout d'abord, la cycline A majoritairement exprimée en fin de phase S et en G2, est la seule cycline à être associée à la régulation de plusieurs phases du cycle cellulaire selon la protéine CDK associée. En fin de phase S, la cycline A est associée à CDK2 permettant l'initiation et l'achèvement de la réplication de l'ADN. L'augmentation du niveau du complexe Cycline A/CDK2 est alors corrélée à l'initiation de la réplication de l'ADN (**Figure 9B**) (Cardoso et al., 1993). En parallèle, ce complexe va phosphoryler des protéines impliquées dans cette même réplication comme CDC6 (Petersen et al., 1999). La cycline A s'associe ensuite en fin de phase S et en G2 à CDK1 car elle change de localisation en passant dans le cytoplasme (Katsuno et al., 2009). Cette interaction est impliquée dans l'activation et la stabilisation du complexe Cycline B/CDK1. La dégradation par la voie du protéasome (ubiquitination) de la cycline A permet la sortie de la mitose.

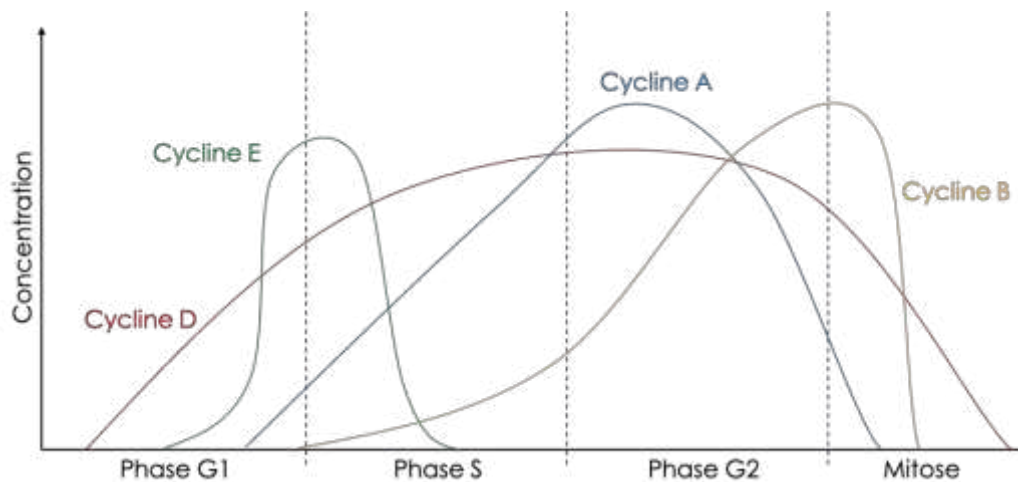


Figure 8 : Expression des cyclines durant le cycle cellulaire.

Chaque cycline est exprimée pour une durée précise pendant le cycle cellulaire. Les cyclines D sont exprimées quasiment tout au long du cycle. La cycline E est exprimée en fin de phase G1 jusqu'en milieu de phase S. L'expression de la cycline A commence en fin de phase G1 mais est essentielle en fin de phase S et en G2. Enfin, la cycline B est essentielle pour la phase de mitose.

La cycline B est une cycline associée à la phase M du cycle cellulaire (Figure 9B). Elle remplace notamment la cycline A pour former un complexe avec CDK1 (Nigg, 2001). C'est ce complexe, appelé MPF, qui va permettre la transition G2/M. Le complexe cycline B/CDK1 est notamment associé à l'expression de la protéine Survivine (une protéine du complexe CPC dont nous parlerons plus tard dans ce chapitre) (Tsukahara et al., 2010). Ce complexe va phosphoryler un grand nombre de

complexes majeurs dans la progression mitotique, tels que les complexes Condensine (S. Abe et al., 2011; Bazile et al., 2010) ou le complexe APC/C (Listovsky et al., 2000), développés plus tard dans ce chapitre.

La cycline D est une cycline exprimée tout au long du cycle cellulaire. Au cours du cycle, elle s'associe avec CDK4 et CDK6 durant la phase G1 pour former le complexe Cycline D/CDK4/CK6 (Kozar & Sicinski, 2005). Le substrat majeur de ce complexe est la protéine suppresseur de tumeur rétinoblastome (Rb) qui séquestre le facteur de transcription E2F. Rb est un des régulateurs majeurs de la transition G1/S (Figure 9B). Il existe deux modèles distincts pour expliquer l'action du complexe Cycline D/Cdk4-6. Cependant, dans les deux modèles, le complexe phosphoryle la protéine Rb dans le but d'activer l'action du facteur de transcription E2F, en permettant le changement de conformation de Rb qui va donc relâcher le facteur E2F, activant ainsi la transcription de protéines telles que l'ADN polymérase α et permettant à la cellule de rentrer en phase S (Khleif et al., 1996; Narasimha et al., 2014).

La cycline E est associée à la transition G1/S (**Figure 9B**). Elle s'associe avec la protéine Cdk2. Le complexe Cycline E/Cdk2 va d'abord permettre la phosphorylation de p27 (inhibition de p27 puis dégradation par ubiquitination), un inhibiteur de la cycline D (Sheaff et al., 1997). Le complexe va également phosphoryler la protéine Rb assurant des fonctions similaires à la phosphorylation par Cycline D/Cdk6 expliquée précédemment (X. Zhu et al., 1996).

De nos jours, chez l'homme, il existe 20 Cdks et 29 cyclines différentes que l'on ne présentera pas ici (Malumbres, 2014).

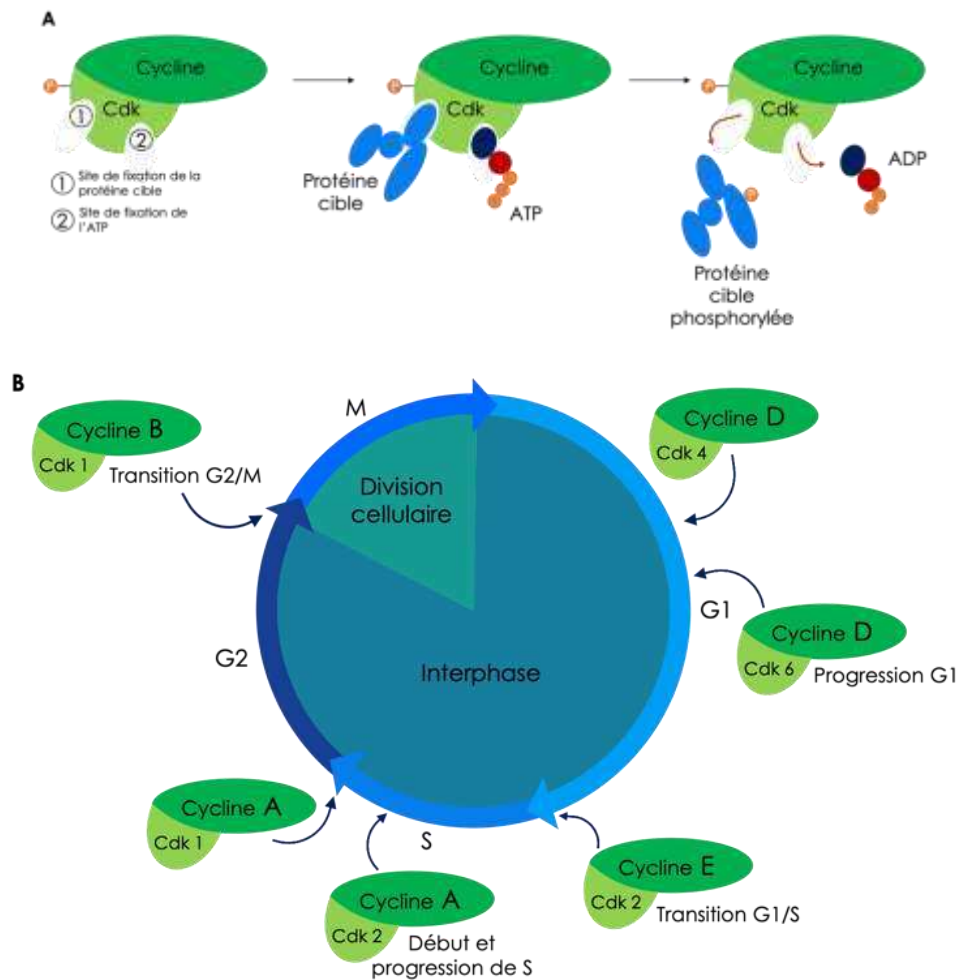


Figure 9 : Mode d'action des cyclines au cours du cycle.

A. Schéma représentant le mode d'action des kinases Cdk après liaison à une cycline. La protéine Cdk possède un site de reconnaissance de la protéine cible et un site de fixation de l'ATP ; le donneur de phosphate. B. Schéma présentant le point d'action des différents complexes Cycline/Cdk durant le cycle cellulaire.

2.2. Les complexes Condensine

En 1994, Tatsuya Hirano et Tim Mitchison ont été les premiers à isoler un dimère de protéines, purifié à partir d'extraits d'œufs de Xénope, capable d'assembler et de maintenir la structure de chromosomes mitotiques *in vitro*. Les protéines composant cet hétérodimère furent nommées XCAP-C et XCAP-E pour Xenopus chromosome-associated protein, et identifiées par la suite comme les sous-unités SMC4 et SMC2 (Structural Maintenance of chromosome) des complexes Condensines (Hirano & Mitchison, 1994). Cette étude fut alors suivie par la description d'un complexe pentamérique composé des sous-unités SMC4 et SMC2, ainsi que de

trois sous-unités supplémentaires nommées CAP-D2, CAP-H et CAP-G (Chromosome-associated protein). Pour la première fois le complexe Condensine fut alors décrit et c'est à ce moment-là que la dénomination Condensine apparut. Il existe deux types de complexes Condensine présentant la même structure. Les deux complexes présentent les mêmes protéines de maintenance structurelle des chromosomes (SMC) 2 et 4. Ces deux protéines sont des ATPases qui interviennent dans la régulation de l'organisation des chromosomes (Cobbe & Heck, 2000, 2004; Jessberger, 2002). Ces deux complexes diffèrent par leurs sous-unités secondaires constituées de trois protéines CAP (**Figure 10A**) (Ono et al., 2003).

Le complexe Condensine I est majoritairement cytoplasmique en interphase et est recruté au niveau des chromosomes après la disparition de l'enveloppe nucléaire en prométaphase (Gerlich et al., 2006). De son côté, le complexe Condensine II est localisé dans le noyau durant tout le cycle cellulaire en se concentrant sur les chromosomes durant la mitose jusqu'en télophase. Le premier complexe Condensine à se fixer sur les chromosomes en mitose est Condensine II, ce qui permet de commencer la condensation des chromosomes mitotiques. Les deux complexes agissent sur la compaction du chromosome avec une action sur la compaction longitudinale pour la Condensine II et une compaction latérale pour la Condensine I (**Figure 10B**) (Green et al., 2012; Hirano, 2012; Ono et al., 2003).

Grâce à leur structure, on imagine que les complexes SMC encerclent l'ADN chromosomique comme cela a été prouvé pour le complexe Cohésine ayant une structure similaire. Cet enroulement autour de l'ADN forme un anneau permettant de compacter le chromosome mitotique. Bien que ces complexes soient essentiels à la compaction des chromosomes, ils ne peuvent agir seuls au cours de ce processus. Les mécanismes moléculaires qui sous-tendent la condensation et la ségrégation correctes des chromosomes par les Condensines sont encore peu connus. Des études menées essentiellement *in vitro* ont attribué plusieurs activités biochimiques aux Condensines : une activité de surenroulement d'ADN double brin circulaire, une activité de renaturation de l'ADN et une activité d'extrusion de boucles d'ADN (pour revue (Hirano, 2012, 2016)).

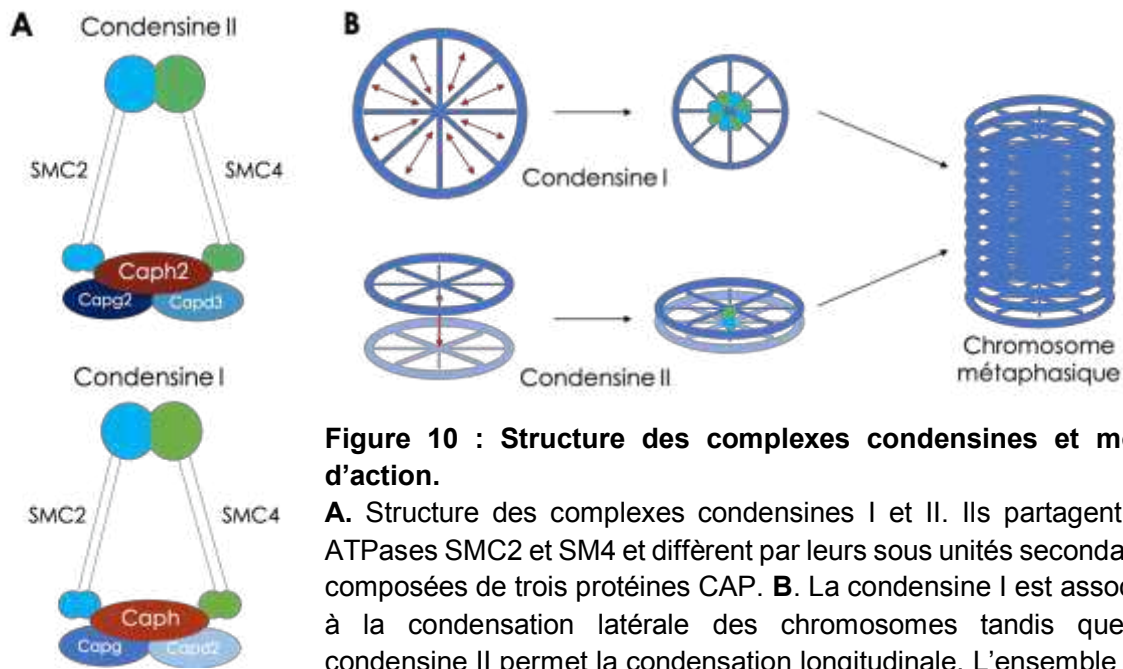


Figure 10 : Structure des complexes condensines et mode d'action.

A. Structure des complexes condensines I et II. Ils partagent les ATPases SMC2 et SM4 et diffèrent par leurs sous unités secondaires composées de trois protéines CAP. **B.** La condensine I est associée à la condensation latérale des chromosomes tandis que la condensine II permet la condensation longitudinale. L'ensemble des actions des deux complexes va permettre la compaction totale du chromosome métaphasique.

2.3. Le complexe APC/C

2.3.1. Présentation du complexe

Le Complexe APC/C, ou *Anaphase Promoting Complex*, est un complexe multiprotéique responsable de la dégradation des protéines par le protéasome grâce à par son activité ubiquitine ligase. Les protéines, une fois poly-ubiquitinylées, seront alors dégradées par le protéasome 26S. Son nom vient de son rôle à la transition métaphase-anaphase (Pickart, 1998, 2004; Young et al., 1998). Sans un complexe APC/C fonctionnel, il n'y aura pas de séparation des chromatides sœurs, bloquant la ségrégation des chromosomes, donc la sortie de la mitose et la génération de deux cellules filles.

Le complexe APC/C se compose d'un ensemble de 11 à 13 sous-unités selon les organismes. On retrouve des protéines structurales telles que APC1, APC4 et APC5. Le complexe présente également un cœur catalytique composé des protéines

APC2, APC11 et de l'ubiquitine ligase E2 lui conférant sa fonction. Pour finir, le complexe contient un sous-complexe composé de trois protéines APC8, APC6 et APC3 ayant pour rôle de coordonner reconnaissance de la protéine cible et fonction catalytique. Le complexe APC possède une structure triangulaire permettant d'accueillir le substrat (**Figure 11**) (Castro et al., 2005; Thornton et al., 2006).

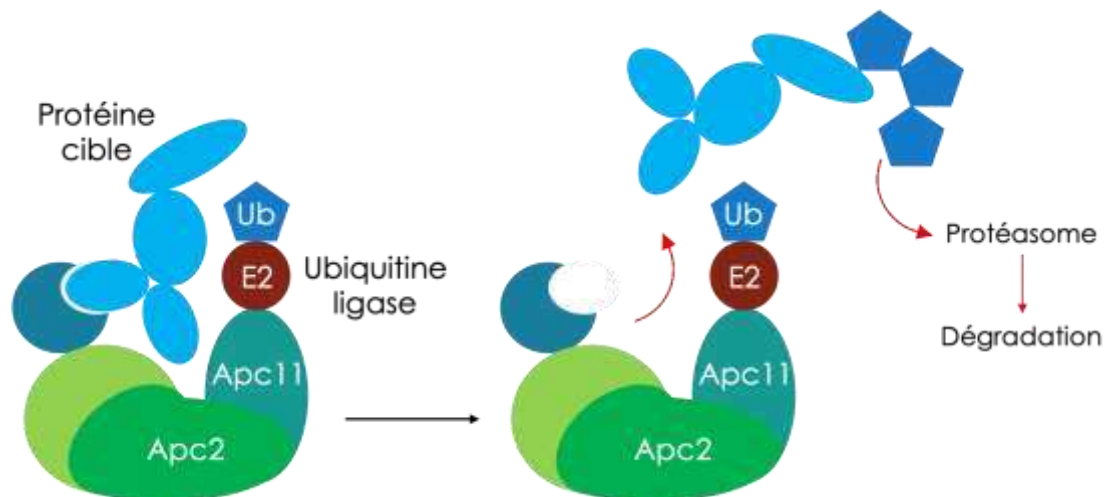


Figure 11. Mode d'action du complexe APC/C.

Le complexe APC/C possède une structure triangulaire permettant de capturer la protéine cible et permettre l'action de sa sous-unité ubiquitine ligase E2 afin d'ubiquitinyler la protéine cible et entraîner sa dégradation par le protéasome 26S. Un hexagone bleu représente le groupement ubiquitine.

2.3.2. Activation du complexe APC/C

Afin d'assurer ses fonctions, le complexe APC/C s'associe avec des co-facteurs co-activateurs, dont les deux principaux sont les protéines CDC20 (Cell division cycle 20) et CDH1 (Cdc20 homologue 1). On notera, par exemple, l'activation du complexe par Cdc20, APC^{Cdc20} . Ces protéines présentent sept domaines WD40 (domaine d'environ 40 acides aminés finissant par tryptophane (W)-aspartate (D), il s'agit d'un motif structurel) en C-terminal impliqués dans la reconnaissance du substrat de APC. La fixation sur APC est permise grâce à la queue IR (Isoleucine-Arginine). CDC20 est également une des cibles du complexe APC/C, car il est notamment dégradé par le complexe APC/C^{Cdh1} . APC^{Cdc20} et APC^{Cdh1} sont finement régulés afin de dégrader leurs cibles au bon moment. En effet, APC^{Cdc20} permet la dégradation des protéines

lors de l'anaphase tandis que APC^{Cdh1} permet la dégradation des protéines lors des phase S et G1 (Castro et al., 2005; J. M. Peters, 1998; Thornton et al., 2006).

2.3.3. Les cibles du complexe APC/C

On distinguera dans cette partie deux types de protéines présentant deux motifs de dégradation distincts. Ces motifs sont reconnus par le complexe APC/C afin d'entraîner la dégradation des protéines qui les contiennent. Tout d'abord, le motif principal de dégradation appelé la D-box (RxxLxxxxN), mis en évidence pour la première fois sur la cycline B, il permet à lui seul d'induire la dégradation de la protéine (Hames et al., 2001). Il peut également être présent sur d'autres protéines pour induire leur dégradation en phase M. Le second motif est la KEN-box (Lysine-Glutamate-Asparagine). Des mutations au sein de ces deux motifs entraineront de ce fait la stabilisation de la protéine (Lara-Gonzalez et al., 2011).

APC/C^{Cdc20} et APC/C^{Cdh1} ne reconnaissent pas les mêmes substrats. Ils peuvent donc agir à différents moments du cycle cellulaire. Certaines études mettent en évidence l'importance du motif de dégradation dans la reconnaissance par l'un ou l'autre complexe. En effet, il apparait que APC/C^{Cdc20} reconnaît préférentiellement les D-box tandis que APC/C^{Cdh1} va préférentiellement s'associer aux protéines présentant une KEN-box. Cependant, certains substrats présentant une D-box sont également reconnus par APC/C^{Cdh1}. Il est suggéré dans la littérature qu'il pourrait exister de légères différences au sein du site consensus, ou des modifications post-traductionnelles sur ou autour du site pouvant influencer la reconnaissance (Da Fonseca et al., 2010; Hames et al., 2001; Yamano et al., 2004). Par exemple, La cycline B est ubiquitinylée en fin de phase M par le complexe APC/C^{Cdc20}, tandis que c'est le complexe APC/C^{Cdh1} qui catalyse cette réaction en G1.

Lors de la mitose, APC/C^{Cdc20} va induire l'ubiquitination de la Sécurine en début d'anaphase permettant l'action de la Séparase (enzyme qui catalyse l'hydrolyse de la cohésine, permettant la séparation des chromatides sœur en anaphase) (**Figure 12**) (Terret et al., 2003).

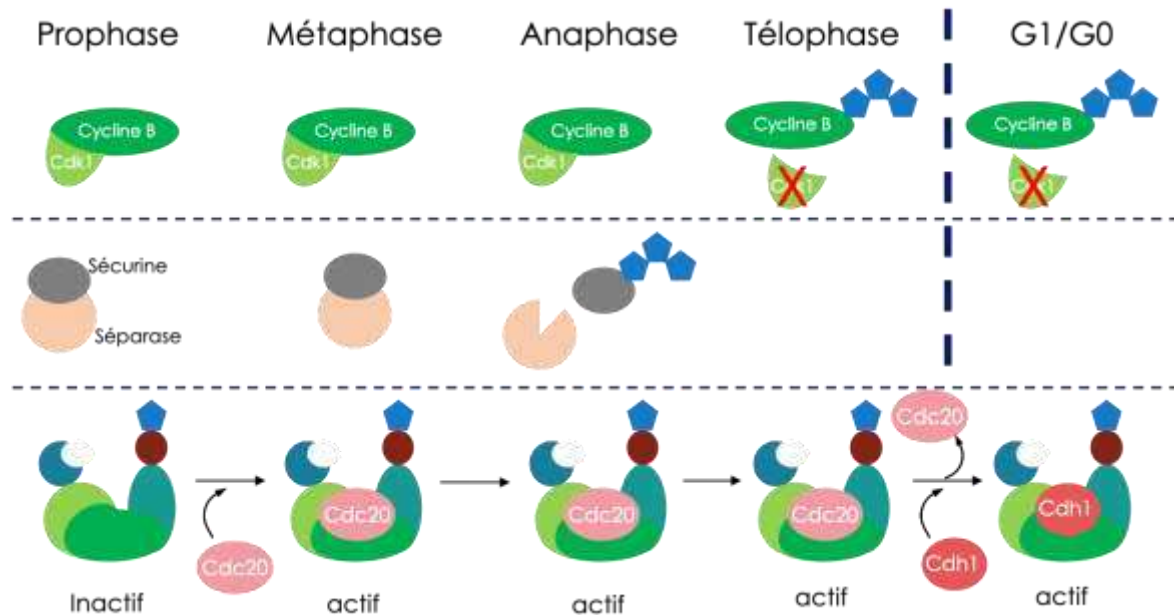


Figure 12 : Mode d'action du complexe APC/C lors de la mitose.

Durant la métaphase, Cdc20 se lie au complexe APC/C afin de l'activer et permettre son action sur la protéine Sécurine. Cela va alors permettre l'activation de la Séparase en anaphase. En fin de mitose le complexe APC/C^{Cdc20} va permettre la dégradation de la cycline B et cette action sera poursuivie par le complexe APC/C^{Cdh1}. Un hexagone bleu représente le groupement ubiquitine. CDK1 devient inactive lors de la dégradation de la Cycline B (Croix rouge).

2.4. Le complexe CPC

Le Chromosome Passenger Complex (CPC) est essentiel tout au long de la mitose. Son implication commence dès la prophase durant laquelle il participe à la condensation des chromosomes. Il est ensuite localisé au niveau des centromères où il permet l'attache des fuseaux mitotiques au kinétochore. Cette étape est importante pour assurer une répartition fidèle des chromatides sœurs entre les deux cellules filles. Au début de l'anaphase, le CPC va perdre son affinité pour les chromosomes métaphasique et se relocaliser au centre du fuseau mitotique. Durant la cytokinèse, le complexe CPC va former le corps central, localisé à l'extérieur des deux cellules filles, dont le rôle est encore peu connu (pour revue (Carmena et al., 2012)).

Le complexe CPC est formé de quatre protéines distinctes : la kinase Aurora B, une protéine centrale, INCENP, et les deux protéines servant notamment à la localisation du complexe, la Survivine et la Boréoline (Kelly et al., 2007; Ruchaud et

al., 2007; van der Waal et al., 2012). Leurs rôles seront détaillés plus loin dans ce chapitre.

Structuralement, le complexe CPC est composé d'une sous-unité enzymatique Aurora B (une kinase) et d'un module de localisation, reliés entre eux par la protéine INCENP. Le module de localisation est composé de la partie N-terminale de INCENP (qui est capable de lier HP1), de la Survivine (qui sera capable de lier H3T3P en mitose) et de la Boréaline, associées les unes aux autres dans un faisceau à trois hélices (Jeyaprakash et al., 2007, 2011b). Le module kinase est composé de Aurora B liée à la partie C-terminale de INCENP par l'IN-BOX hautement conservée (Figure 13) (Adams et al., 2000a).

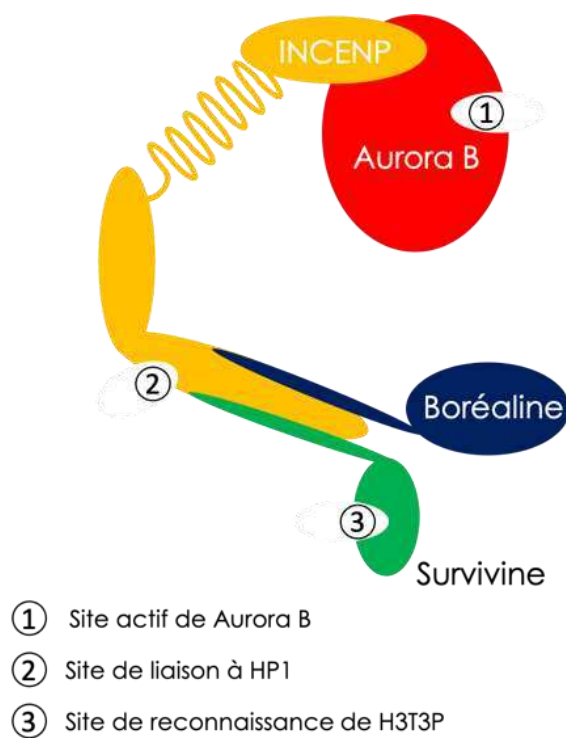


Figure 13 : Structure du complexe CPC.

Le complexe CPC est composé de 4 protéines. La protéine centrale est INCENP sur laquelle se fixe en C-terminal la kinase Aurora B. En N-terminal de INCENP se fixe le module de localisation du complexe CPC composé de la Survivine (capable de reconnaître H3T3P) et de la Boréaline. INCENP possède également un site de liaison à la protéine HP1 (adapté de (Carmena et al., 2012)).

2.4.1. La kinase Aurora B

Avec les kinases dépendantes de la cycline (CDK) et de type Polo kinases (PLK), les kinases Aurora sont des protéines régulatrices qui coordonnent de nombreux processus tout au long de la division cellulaire, notamment en agissant aux points de contrôle guidant et contrôlant la progression de la mitose (Lens et al., 2010).

Aurora B appartient à une famille de sérine-thréonine kinases découvertes pour la première fois chez *Drosophila melanogaster*. Cette famille compte trois membres : Aurora A, active aux pôles du fuseau mitotique ; Aurora B, qui agit au niveau du centromère, du fuseau anaphase et du cortex cellulaire ; et Aurora C, homologue à Aurora B, mais régule la méiose et la mitose au début du développement (Carmena et al., 2009; Glover et al., 1995).

L'activité de Aurora B est régulée par de nombreuses phosphorylations-déphosphorylations tout au long du cycle cellulaire. Son activation est étroitement liée à sa liaison à INCENP qui va permettre un changement de conformation du site actif de Aurora B. INCENP agit alors comme une cycline dans la liaison et l'activation de Aurora B. Elle contribue également à sa localisation permettant son action à différents points de passage de la mitose (Adams et al., 2000a; Honda et al., 2003). On discutera plus précisément de l'action de Aurora B dans les paragraphes suivants (**Figure 14**).

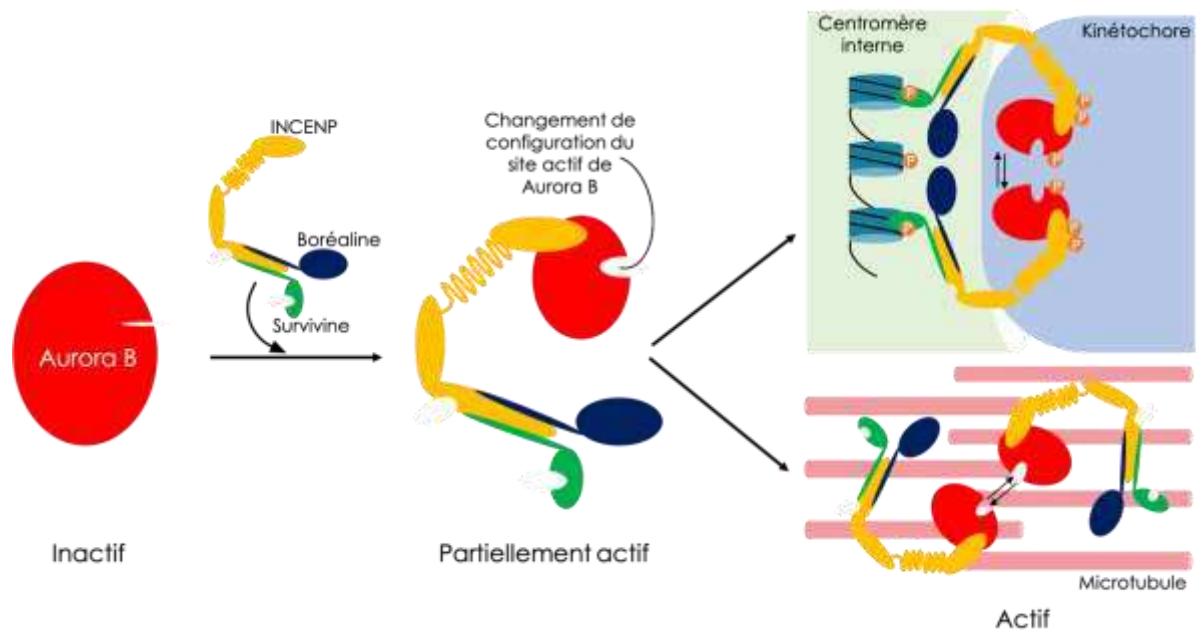


Figure 14 : Activation de Aurora B et localisation du complexe CPC.

L'activation de Aurora B est couplée à la localisation du CPC. Le module de localisation de INCENP, de la Survivine et de la Boréaline cible le CPC sur les histones du centromère interne et les microtubules de la zone centrale du fuseau pendant la mitose précoce et tardive, respectivement. L'enrichissement du CPC à ces emplacements facilite l'auto-phosphorylation en trans, conduisant à l'activation complète de Aurora B (adapté de (Carmena et al., 2012)).

2.4.2. La protéine du centromère interne, INCENP

INCENP (*INner CENTromère Protein*) est une protéine servant de plateforme pour l'ensemble des différentes sous-unités du complexe CPC. C'est la première protéine du complexe CPC à avoir été identifiée (Cooke et al., 1987). Tout d'abord, au niveau de la partie N-terminale de INCENP, on retrouve une triple hélice alpha permettant l'interaction avec la Survivine et la Boréaline (Jeyaprakash et al., 2007). Cette partie N-terminale est essentielle pour la localisation de INCENP (et du complexe CPC) aux centromères, au niveau de la zone centrale du fuseau mitotique en anaphase et télophase et pour finir au niveau du corps central (Ainsztein et al., 1998). INCENP a également la particularité d'interagir avec la protéine HP1 (montré initialement dans un crible double hybride) (Kang et al., 2011). L'interaction entre INCENP et HP1 pourrait favoriser la libération d'INCENP des chromosomes avec la phosphorylation de H3S10 par Aurora B qui va mettre en jeu le mécanisme de

méthyl/phospho *switch* permettant de détacher HP1 du centromère interne (décrit ci-dessus) et déclencher le ciblage vers la zone médiane du fuseau permettant la relocalisation du CPC en anaphase (**Figure 15A**) (Yamagishi et al., 2010). Bien que l'interaction INCENP-HP1 soit démontrée, que son rôle ait pu être mis en lumière, il reste des zones d'ombre sur les mécanismes moléculaires impliqués dans ce fonctionnement. De plus, l'extrémité C-terminale de INCENP contient le domaine IN-box, qui se lie à Aurora B et l'active. Lors de la liaison à INCENP, Aurora B phosphoryle un motif thréonine-sérine-sérine (TSS) conservé, situé près de l'extrémité C-terminale de la IN-box (**Figure 15A**) (Adams et al., 2000a). Cela favorise le regroupement des CPC, conduisant à la phosphorylation en *trans* de la thréonine 232 (Th232) de la T-loop de Aurora B, permettant l'activation complète de la kinase (**Figure 14**) (Sessa et al., 2005).

INCENP est régulée par de nombreuses modifications post-traductionnelles, majoritairement par phosphorylation (**Figure 15B**). Les principales kinases responsables de sa phosphorylation sont Aurora B, mais également CDK1 et PLK1. Chez la levure, la phosphorylation de l'homologue de INCENP, Sli15, par CDK et par l'homologue de Aurora B, Ipl-1, empêche le CPC de s'associer au niveau de la zone centrale du fuseau mitotique avant l'anaphase (Mirchenko & Uhlmann, 2010; Nakajima et al., 2011; Pereira & Schiebel, 2003). La phosphorylation de INCENP est également essentielle pour activer le point de contrôle d'assemblage du fuseau. Cela va alors permettre, grâce à l'activité de Aurora B et du mouvement du domaine hélice alpha de INCENP, de rapprocher la kinase de ses différents substrats. Ces cascades de phosphorylation sont essentielles pour contrôler la tension au niveau des kinétochores, empêchant ainsi la ségrégation des chromosomes jusqu'à ce que les attaches appropriées des kinétochores et des microtubules soient formées. La déphosphorylation de ces sites au début de l'anaphase est nécessaire pour empêcher la réactivation du point de contrôle lorsque les chromatides sœurs se séparent au début de l'anaphase, leurs kinétochores n'étant plus sous tension (Mirchenko & Uhlmann, 2010; Vázquez-Novelle & Petronczki, 2010).

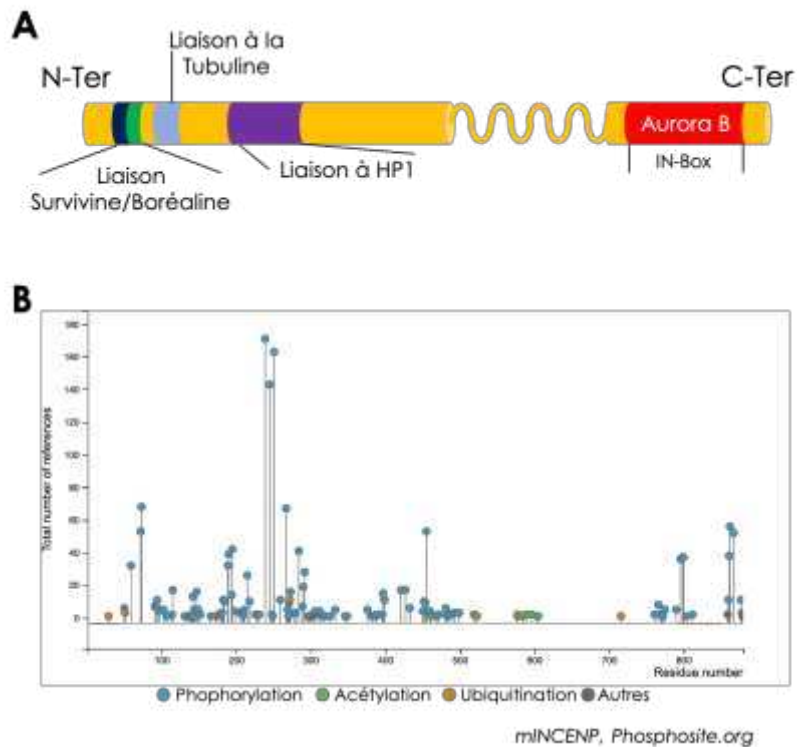


Figure 15 : Structure de la protéine INCENP et ses modifications post-traductionnelles.

A. Structure de INCENP, qui interagit avec Aurora B en C-terminal au niveau de sa IN-Box. Elle possède une hélice alpha en son centre. INCENP interagit avec les deux sous-unités du complexe CPC, Survivine et Boréaline en N-terminal. INCENP possède un site de liaison à la Tubuline et à la protéine HP1. B. Graphique représentant les différentes modifications post-traductionnelles connues de INCENP murin. Ces modifications ont pu être identifiées au cours d'études mécanistiques ou au cours de cribles.

2.4.3. La Survivine et la Boréaline

La Survivine est composée d'un domaine BIR (Baculovirus IAP Repeat, ou domaine d'inhibition de l'apoptose) en N-terminal et d'une extension C-terminale hélicoïdale. Chez les vertébrés, le domaine BIR est essentiel au recrutement du CPC au centromère mais ne semble pas être impliqué dans sa localisation à partir de l'anaphase (Lens et al., 2006; Szafer-Glusman et al., 2011). Cependant, chez *D. melanogaster*, une mutation dans le domaine BIR empêche la localisation du CPC au niveau de la zone centrale du fuseau en anaphase sans affecter sa localisation centromérique, indiquant une contribution du domaine BIR à la localisation du CPC pendant l'anaphase. La Survivine permet également l'activation de Aurora B grâce à

sa reconnaissance et à sa liaison à la thréonine 3 phosphorylé de l'histone H3 (H3T3P).

La Survivine a été décrite à l'origine comme un inhibiteur de la protéine d'apoptose (IAP) qui, accumulée dans les cellules en phase G2, a été proposée pour réguler négativement la mort cellulaire en mitose. La Survivine possède un signal export nucléaire. Dans la littérature, il est suggéré que la Survivine cytoplasmique inhibe la mort cellulaire, tandis que la Survivine dans le noyau ou associée au CPC, régule la mitose (Ambrosini et al., 1997; Connell et al., 2008; Uren et al., 1999).

La Survivine est, comme les autres sous-unités du complexe CPC, régulée par de nombreuses phosphorylations. Certaines de ses phosphorylations semblent essentielles pour l'interaction entre la Survivine et la Boréaline mais le mécanisme sous-jacent est encore mal connu. La Survivine est également ubiquitinylée, ce qui régule la dynamique de liaison du CPC au centromère. L'ubiquitination sur sa lysine 63 (K63) établie par Ufd1 favorise l'association de la Survivine avec les centromères, alors que la désubiquitination réalisée par hFAM est nécessaire pour sa dissociation (Vong et al., 2005).

La Boréaline (également connue sous le nom de Dasra) a été découverte dans deux études indépendantes sur des protéines associées aux chromosomes mitotiques et aux échafaudages chromosomiques (Gassmann et al., 2004; Sampath et al., 2004). L'extrémité N-terminale de la Boréaline fait partie du faisceau à trois hélices qui constitue le module de localisation du CPC (Jeyaprakash et al., 2011a). Les homologues de Boréaline chez la levure (Nbl1) sont très courtes par rapport à leurs homologues chez les vertébrés mais conservent la région impliquée dans la formation de faisceaux à trois hélices, suggérant qu'il s'agit d'une fonction conservée au cours de l'évolution de la Boréaline (Gall et al., 2009).

Comme les autres membres du CPC, la Boréaline est régulée par phosphorylation sur plusieurs sites. La phosphorylation de la Boréaline par CDK1 est requise pour les interactions avec Shugoshin 1 et 2, importantes pour le ciblage du CPC aux centromères (Tsukahara et al., 2010). La Boréaline est la protéine la moins bien caractérisée du complexe CPC.

3. LA REGULATION DU COMPLEXE CPC

3.1. Le complexe CPC en interphase et en début de mitose

3.1.1. Le CPC en interphase

De manière générale, les protéines du CPC sont exprimées en fin de phase G2 et seront dégradées en fin de mitose.

En interphase, le CPC est tout d'abord localisé à la fin de la phase S au niveau de l'hétérochromatine péri-centromérique grâce à l'interaction entre HP1 et INCENP. Le complexe passager chromosomique (CPC) est dirigé vers les centromères pendant la mitose via la liaison à H3T3ph et Sgo1. HP1 recrute fortement le CPC, déstabilisant les interactions kinétochore-microtubules et activant le point de contrôle de l'assemblage du fuseau. Lors de la sortie mitotique, le HP1 captif piège le CPC actif au niveau des centromères. Ces clusters HP1-CPC restent catalytiquement actifs tout au long du cycle cellulaire. Il existe également des interactions entre HP1 endogène et le CPC au cours de G2. HP1 α et HP1 γ coopèrent pour recruter le CPC dans des loci actifs dans un processus indépendant de CDK1. H3S10ph apparaît bien avant que H3T3 ne soit phosphorylé par la kinase Haspin. HP1 peut concentrer et activer le CPC au niveau de l'hétérochromatine centromérique dans G2 avant que la phosphorylation médiée par Aurora B de H3S10 libère HP1 de la chromatine et permette aux voies dépendantes de H3T3ph et Sgo1 de rediriger le CPC vers les centromères mitotiques (Trivedi et al., 2019).

3.1.2. Le CPC en début de mitose

En début de mitose, Aurora B établit la phosphorylation de la Sérine 10 de l'histone H3 (H3S10P), une marque des chromosomes mitotiques (Hirota et al., 2005).

Le rôle de cette phosphorylation est bien connu dans le bourgeonnement de la levure notamment pour la compaction des chromosomes en anaphase, mais ce rôle n'est pas encore vraiment défini chez les eucaryotes multicellulaires (Neurohr et al., 2011). Cette phosphorylation va notamment permettre libération de la protéine HP1 (qui était fixée sur H3K9me3, cf méthyl/phospho *switch* discuté précédemment) (Nozawa et al., 2010). Cela va notamment favoriser la relocalisation du CPC et de HP1 au niveau des centromères. Une des fonctions du CPC est la compaction des chromosomes mitotiques à travers la régulation des complexes Condensine. Cette régulation se fait notamment via la phosphorylation par Aurora B de la protéine Cap H, permettant le recrutement du complexe Condensine I au niveau des chromosomes mitotiques (Lipp et al., 2007).

Le CPC permet également la régulation de l'attachement entre les microtubules et le kinétochore. En effet, pour que la mitose puisse aller à son terme, la structure du kinétochore ainsi que son attachement correct aux microtubules du faisceau mitotique est une étape clé. Cette interaction est notamment stabilisée par la tension des microtubules (Nicklas & Koch, 1969). L'activité de Aurora B et la Boréaline sont essentielles dans ce processus. En effet, un défaut de l'une ou l'autre de ces deux protéines entrainera un défaut d'attachement des microtubules pouvant se traduire par un attachement mérotélique ou syntélique (**Figure 16**) (Knowlton et al., 2006; Rosasco-Nitcher et al., 2008). De plus, les microtubules contrôlent la phosphorylation du kinétochore par le CPC d'une manière indépendante de la tension via un site de liaison aux microtubules sur la sous-unité boréaline. La perturbation des interactions boréaline-microtubules génère une phosphorylation réduite des kinétochores en prométaphase, des attachements kinétochore-microtubules inappropriés et des signaux de point de contrôle du fuseau affaiblis. Des preuves expérimentales et de modélisation suggèrent que la phosphorylation du kinétochore est fortement stimulée lorsque le CPC se lie aux microtubules qui se trouvent près du centromère interne. Le CPC détecte son environnement local à travers des structures de microtubules pour contrôler la phosphorylation des kinétochores (Trivedi et al., 2019).

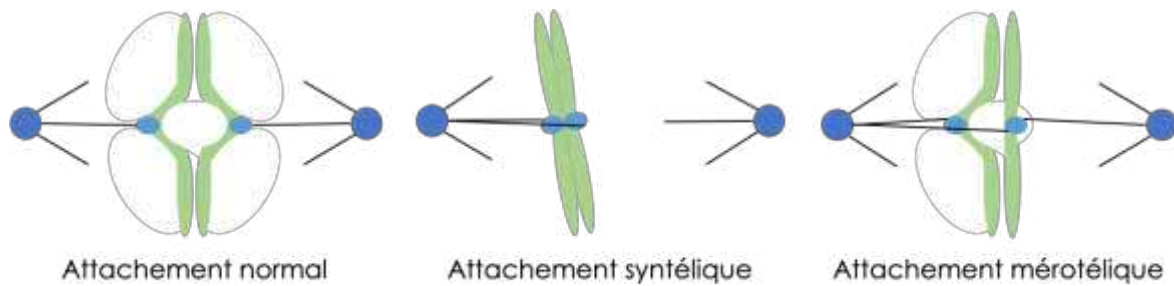


Figure 16 : Les attachements des microtubules aux chromosomes.

Schéma représentant un attachement correct des microtubules aux deux chromatides ou un attachement anormal, soit syntélique (au centre) où les deux chromatides sœurs sont attachées au même centrosome et soit mérotélique (à droite) où une même chromatide va être attachée par les microtubules aux deux centrosomes en même temps.

Pour rappel, en mitose, les kinétochores que l'on retrouve au niveau des centromères des chromosomes s'attachent aux microtubules à l'aide du réseau de protéines KMN – un réseau de protéines du kinétochore externe, qui tient son nom de la protéine KNL1 et des complexes Mis12, Ndc80 (KMN). Cette interaction est régulée par un ensemble de phosphorylations sur Ndc80 catalysées par Aurora B (Cheeseman et al., 2006). L'absence de phosphorylation entraînera une interaction KMN-microtubules trop importante ce qui conduira à un grand nombre d'attachements mérotéliques et syntéliques. À l'inverse, la phosphorylation de Mis12 et KLN-1 (toujours par Aurora B) permettra une diminution de la liaison KMN-microtubule (Alushin et al., 2010; Cheeseman et al., 2006; Welburn et al., 2010). Ensemble, ces données indiquent que Aurora B est une protéine majeure dans la régulation de la liaison KMN-microtubule. En plus de sa fonction de régulateur dans la liaison KMN-microtubule, Aurora B permet la stabilisation des microtubules eux-mêmes à travers la phosphorylation d'une protéine MCAK, associée à la Kinésine (protéine motrice ATP dépendante permettant le transport de molécules le long des microtubules). Cette protéine n'agit pas comme un moteur moléculaire mais est impliquée dans la dépolymérisation des microtubules (**Figure 17A**). Une autre cible permettant la stabilisation des microtubules est la protéine mDia3 (une protéine de la sous famille des Formines, liée à la GTPase Rho). Aurora B va alors phosphoryler Ndc80 et mDia3 si la tension d'attachement des microtubules n'est pas suffisante. Cette phosphorylation résulte en une perte d'affinité de Ndc80 et de mDia3 pour les microtubules et permettra la déstabilisation de la liaison kinétochore-microtubule (**Figure 17B**) (Cheng et al., 2011).

Initialement, le CPC grâce à l'action de Aurora B fut également montré comme essentiel dans le contrôle du fuseau mitotique chez la levure. Le point de contrôle de l'assemblage du fuseau mitotique (SAC, *Spindle Assembly Checkpoint*), qui est en réalité la transition entre la métaphase et l'anaphase, contrôle le bon attachement des chromatides sœurs aux microtubules avant leur séparation. Aurora B agit avec l'aide de MPS1 et BuBR1 dans le but de bloquer ce point de contrôle et de prévenir une séparation prématurée des chromatides sœurs (Jelluma et al., 2008).

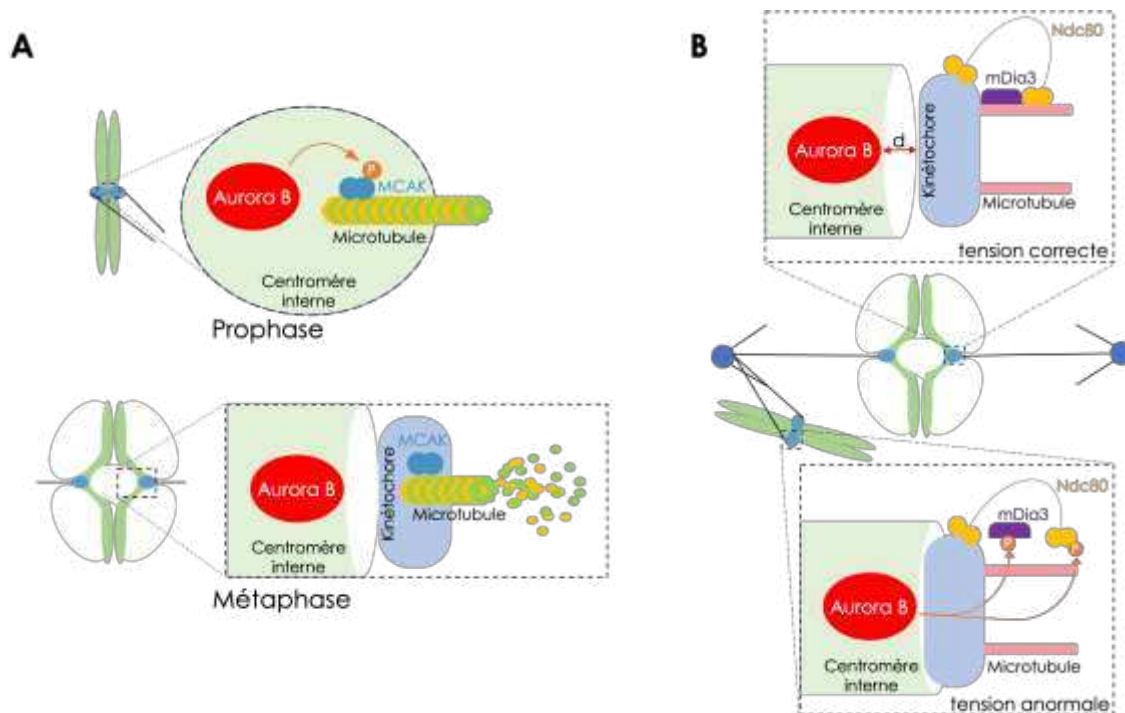


Figure 17 : Contrôle de Aurora B sur la tension entre les microtubules et le kinétochore.

A. En prophase, Aurora B inhibe l'action de MCAK en la phosphorylant, ce qui empêchera la dépolymérisation des microtubules afin de stabiliser l'attachement. A ce stade, les deux protéines sont localisées au niveau du centromère interne. En métaphase, Aurora B sera elle localisée au sein du centromère interne tandis que MCAK sera dans le kinétochore. Cette distance empêchera alors la phosphorylation de MCAK permettant ainsi la dépolymérisation des microtubules. La fonction de cette dépolymérisation est encore mal comprise. B. Aurora B va contrôler la tension, et l'attachement entre les kinétochores et les microtubules. Si la tension est correcte, Aurora B sera trop loin (distance d) pour effectuer son action kinase, le complexe Ndc80/mDia3/microtubule sera alors stable. Si la tension est trop faible, Aurora B sera à proximité physique de son substrat mDia3 et va donc le phosphoryler pour déstabiliser le complexe Ndc80/mDia3/microtubule ne permettant pas de passer le point de contrôle.

3.1.3. Le CPC en fin de mitose

Lors de la transition métaphase-anaphase, les CPC se relocalise au niveau du fuseau central. Il restera au centre de ce fuseau pendant la télophase jusqu'en fin de cytokinèse, formant ainsi un corps central (le *midbody*) entre les deux cellules filles attachées par des microtubules. Cette relocalisation du CPC est notamment assurée par une diminution de l'activité de CDK1 couplée à l'action de phosphatases. La dissociation du CPC avec les chromosomes est due tout d'abord, à une déphosphorylation de H3T3P (site de fixation de la Survivine) en début d'anaphase. Cette relocalisation est également permise grâce à la déphosphorylation de INCENP. Cette déphosphorylation permet alors l'interaction de INCENP et de Aurora B avec la protéine MKLP2 (protéine de liaison des microtubules au centre du fuseau) (Hümmer & Mayer, 2009).

L'activité kinase de Aurora B ainsi que la phosphorylation de INCENP sur sa Sérine 197 sont également essentielles pour la relocalisation du complexe CPC au niveau du corps central (F. Yang et al., 2007).

INCENP fut la première protéine identifiée comme étant relocalisée au milieu du fuseau pendant l'anaphase (Cooke et al., 1987). La structure de cette zone centrale est essentielle pour la relocalisation du CPC. On assiste alors à un regroupement des microtubules au centre grâce aux protéines PRC1, KIF4 et le complexe Centralspindline : MKLP1 et MgcRacGap (Rho GTPase) (Kurasawa et al., 2004). La phosphorylation de MKLP1 par Aurora B va permettre de relocaliser le complexe Centralspindline au niveau des microtubules permettant alors le regroupement des microtubules en fin d'anaphase (**Figure 18**).

3.1.4. Le CPC durant la cytokinèse

Lors de la cytokinèse se forme un anneau contractile coordonné avec la ségrégation des chromosomes. Ce mécanisme est notamment régulé par le CPC à travers son action dans la formation du fuseau central, dans la pénétration du sillon et l'abscision grâce à la contraction de l'anneau contractile (**Figure 18**).

En effet, le CPC contribue à la maturation de l'anneau contractile et sa constriction par la régulation de RhoA (GTPase permettant la polymérisation de l'actine et de la myosine II). Le CPC va alors recruter le complexe Centralspindline dans la zone centrale du fuseau permettant l'action de Aurora B. Aurora B va alors phosphoryler MgcRacGap afin de permettre son activité Rho GTPase. Là encore, Aurora B assure la régulation et le contrôle de l'avancée de la cytokinèse grâce à la phosphorylation de RhoA, ce qui l'empêche de se lier aux microtubules (Douglas et al., 2010).

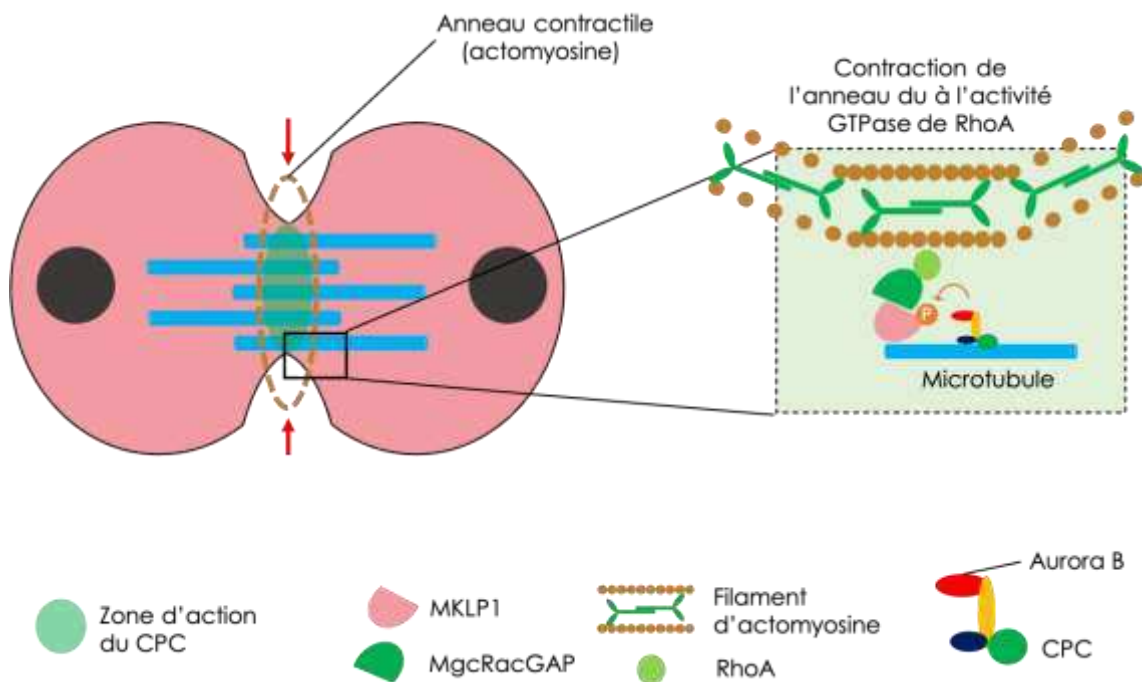


Figure 18 : Rôle du CPC dans le resserrement de l'anneau contractile en anaphase

Aurora B va phosphoryler la protéine MKLP1 qui va alors interagir avec MgcRacGAP pour former le complexe Centralspindline. Cela va permettre ensuite la fonction RhoGTPase de MgcRacGAP sur RhoA et ainsi resserrer l'anneau contractile.

Le mécanisme par lequel l'anneau contractile se contracte est encore peu connu mais les protéines candidates à cette fonction sont les Septines. Ces protéines sont d'ailleurs essentielles dans la cytokinèse dans de nombreuses espèces, comme chez l'Homme - Aurora B pourrait permettre la régulation des Septines en les phosphorylant mais ceci n'est pas encore démontré, bien que Septine 1 soit phosphorylée par Aurora B *in vivo* (Qi et al., 2005). L'activité kinase de Aurora B est

essentielle dans l'interaction entre le cytosquelette et les protéines liées aux microtubules.

Le CPC favorise également le désassemblage des filaments intermédiaires (le squelette de la cellule) à travers des phosphorylations de protéines comme la Vimentine, les Lamine ou la Desmine. Cela favorise alors la pénétration du sillon et la contraction de l'anneau contractile pour faciliter l'abscission (Heald & McKeon, 1990). L'anneau pourra plus facilement se contracter à mesure que le cytosquelette de la cellule se déstabilise.

Pour finir, le mécanisme d'action précis du CPC au moment de l'abscission est encore peu connu. Cependant, il a été montré que la Boréoline interagit avec CHMP4C un membre du complexe ESCRT-III (Endosomal Sorting Complex Required for Transport III) (Capalbo et al., 2012). Cela permettrait à Aurora B à travers la phosphorylation de CHMP4C de contrôler l'abscission (**Figure 19**).

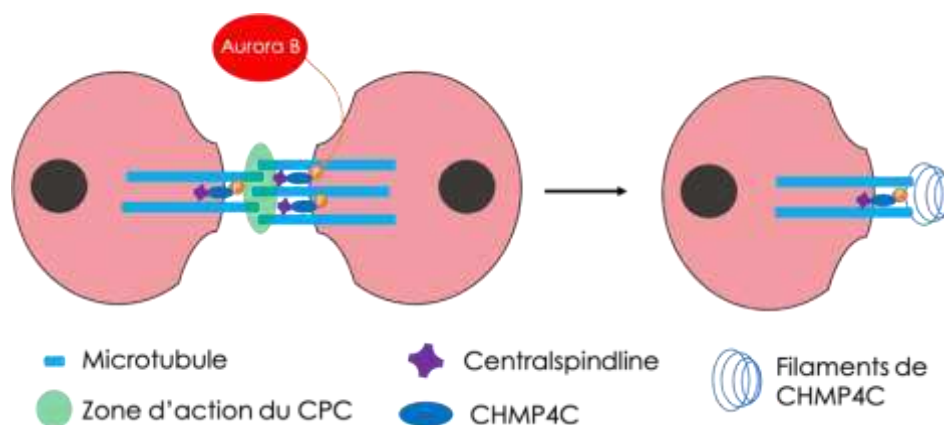


Figure 19 : Rôle du CPC dans l'abscission

Durant la fin de la télophase, Aurora B va phosphoryler CHMP4C. Cela donnera lieu en fin de mitose à la coupure des microtubules reliant les deux cellules filles, ce que l'on nomme l'abscission due à la formation de filaments par les protéines CHMP4C.

4. DEREGULATION DE LA MITOSE ET PHYSIOPATHOLOGIE

La mitose est un processus très important dans le cycle cellulaire et pour l'homéostasie tissulaire. Une erreur au moment de cette phase peut conduire à une altération génomique qui impliquerait une variation du caryotype de la cellule. Cela est

dû notamment à la perte ou au gain d'un ou plusieurs chromosomes au moment de la division cellulaire. Cette variation du nombre de chromosomes est appelée aneuploïdie (Hindriksen et al., 2015). On discutera dans ce chapitre des erreurs à l'origine de cette instabilité et les conséquences que cela peut avoir pour la cellule.

4.1. Les sources d'erreurs mitotiques

Les premières sources d'erreurs en mitose sont les défauts du point de contrôle d'assemblage du fuseau. Pour rappel, ce point de contrôle permet d'inhiber la transition métaphase/anaphase en cas de défaut de tension entre les kinétochores et les microtubules *via* une cascade de phosphorylation. L'inactivation de ce point de contrôle va donc conduire à un défaut de ségrégation des chromosomes au moment de l'anaphase. Cela aura un impact sur le développement et sur la viabilité des cellules filles. Un défaut au niveau de ce point de contrôle (pouvant provenir par exemple d'une mutation d'un gène codant pour une protéine impliquée dans ce point de contrôle) peut alors entraîner une anaphase précoce déclenchée avant que le kinétochore ne soit correctement fixé aux microtubules. Des recherches ont mis en évidence dans des modèles murins qu'une erreur au niveau de ce point de contrôle favorise l'aneuploïdie (nombre anormal de chromosomes pour une cellule) et l'instabilité génomique dû à une mauvaise quantité de matériel génétique.

La liaison entre les kinétochores et les microtubules est également un événement essentiel pour une mitose réussie. L'instabilité chromosomique est très étroitement liée à des défauts d'attachement des microtubules au kinétochore, avec notamment des problèmes d'attachement mérotolique (Mcvey et al., 2021). Ces mauvais attachements sont très généralement la cause de chromosomes latents en anaphase. En effet, il est essentiel que l'attachement microtubule-kinétochore soit correctement orienté afin de permettre la bonne ségrégation des chromatides sœurs au pôle de la cellule en division. Une mauvaise ségrégation des chromatides sœurs en anaphase pourra entraîner une perte de matériel génétique. Cela est dû à la reformation de l'enveloppe nucléaire alors que les chromosomes ne sont pas encore séparés correctement, entraînant très souvent une cassure du chromosome et l'apparition de micronoyaux.

En parallèle de cet attachement microtubule-kinétochore, la cellule doit réguler la stabilité de cette liaison. Dans un cas normal, des erreurs d'attachements entraînent une déstabilisation de la liaison. En conséquence, une hyper stabilité de cette liaison due à des surexpressions de certaines protéines impliquées, comme MAD2 (Mitotic Arrest Deficient 2), augmentera le risque d'attachement microtubule-kinétochore défectueux (Chen et al., 1996). Cependant, on ne connaît toujours pas bien les causes précises de l'augmentation de cette stabilité.

Pour finir, il existe de nombreuses autres causes pouvant produire des erreurs en mitose, comme un défaut d'amplification des centrosomes (certaines cellules pourront avoir trois ou plusieurs centrosomes) ou de leurs orientations car cela va impacter la bonne répartition des chromatides sœurs durant la mitose. Certaines cellules ayant déjà commis des erreurs mitotiques comme des cellules binucléées (défaut de séparation des cellules filles en fin de mitose, pouvant être dû à un défaut d'abscission par exemple) tétraploïdes pourront également se diviser, augmentant leur chance de voir apparaître des défauts importants au moment de la cytokinèse.

4.2. Les conséquences des erreurs en mitose

Les principales conséquences d'un défaut mitotique pour les cellules sont des dommages à l'ADN. Il s'agit de la principale source d'aneuploïdie. Ces dommages sont également liés à des erreurs de ségrégation chromosomique. Un retard en anaphase rendra également la cellule plus sujette à des cassures de l'ADN favorisant une altération de la structure des chromosomes. Ce changement structurel est établi comme pouvant être moteur notamment de la tumorigenèse.

En plus de cassure de l'ADN, une mauvaise ségrégation des chromosomes peut conduire à l'apparition de micronoyaux. Ces micronoyaux possèdent une enveloppe nucléaire particulièrement fragile, exposée à une rupture spontanée. L'ADN de ce micronoyaux se retrouve donc au sein du cytoplasme, à la merci de molécules cytoplasmiques capables de le dégrader ou de l'endommager.

Des dommages massifs à l'ADN survenant sur des chromosomes isolés dans des micronoyaux peuvent produire des motifs complexes de réarrangements

chromosomiques localisés, très proches de ceux observés suite à un processus connu sous le nom de « chromothripsis » (Maher & Wilson, 2012). Ce processus est dû à l'explosion d'un ou plusieurs segments de chromosomes et un réassemblage aléatoire des fragments générés. Ce type de processus est particulièrement observé dans différents cancers. Ces altérations ont été observées dans un large éventail de types de tumeurs et se produisent à une fréquence plus élevée dans des types spécifiques de cancers, y compris du sang et du cerveau. Par conséquent, la partition des chromosomes en micronoyaux offre une explication mécanistique attrayante pour savoir comment les erreurs mitotiques favorisent l'acquisition de dommages à l'ADN hautement localisés (pour revue (Potapova & Gorbsky, 2017)).

Pour finir, ces erreurs mitotiques peuvent entraîner l'activation de la protéine p53 entraînant une sortie du cycle ou l'apoptose.

Durant ma thèse, j'ai d'abord cherché à identifier de nouvelles cibles non histones pour SETDB1 et j'ai pu identifier que la protéine INCENP pouvait être une de ces cibles non histones pour SETDB1.

RESULTATS

PARTIE 1 : IDENTIFICATION GLOBALE DES SUBSTRATS POTENTIELS DE SETDB1

Depuis quelques années, il est apparu que les histones lysines méthyltransférases ne méthylent pas uniquement les histones. En effet, ces enzymes méthylent également des substrats non histones, qui sont pour la plupart encore inconnus. Par exemple, SETDB1 est capable de méthyliser des facteurs de transcription, comme UBF (Upstream Binding Factor) (Hwang et al., 2014) et le suppresseur de tumeurs p53 (Fei, Shang, et al., 2015), ou même de s'auto-méthyliser (non publié, thèse Paola Cruz Tapias). Au sein de notre équipe, nous nous sommes alors intéressés aux cibles non histones de SETDB1. Ainsi, dans le but d'identifier de façon la plus exhaustive possible les potentiels substrats non histones de SETDB1, nous avons décidé d'utiliser deux approches. La première approche est appelée PTMScan, basée sur l'utilisation d'anticorps dirigés contre les lysines méthylées. La deuxième approche est le MBT pull-down, basée sur l'utilisation d'un domaine protéique qui lie les lysines méthylées. Les deux approches sont associées à la spectrométrie de masse pour identifier les protéines méthylées.

Les résultats des approches PTMScan et MBT pull-down sont présentés ci-après, incluant le matériel et les méthodes utilisés. Le MBT pull-down est détaillé dans le manuscrit présenté dans la deuxième partie des résultats.

1. SCAN DES MODIFICATIONS POST- TRADUCTIONNELLES (PTMScan) : *combinaison du SILAC (Stable Isotope Labelling using Amino acids in Cell culture), de l'immunoprécipitation et de la spectrométrie de masse*

Dans des cellules souches embryonnaire de souris (mESC) dans lesquelles nous pouvons induire un KO conditionnel de SETDB1, nous avons réalisé une identification des protéines méthylées sur lysine à l'aide la méthode de PTM-Scan

couplée au SILAC et la spectrométrie de masse. Pour cela, nous avons cultivé les mESC dans un milieu spécifique contenant des lysines « légères » pour les cellules exprimant SETDB1 et un milieu contenant des lysines « lourdes » pour les cellules où nous avons induit le KO de SETDB1 (**Figure 20**). Nous avons vérifié auparavant que ces conditions de culture n'altèrent pas la synthèse protéique ni la physiologie des cellules mESC.

Une fois les protéines extraites des deux conditions de cultures, avec ou sans SETDB1, nous les avons mélangées comme elles sont identifiables car contenant des lysines « légères » (avec SETDB1) ou « lourdes » (sans SETDB1). Cette approche offre l'avantage de pouvoir traiter exactement de la même façon les deux échantillons et supprime les biais techniques. Nous avons ensuite digéré les protéines à la trypsine, purifié les peptides résultants et les avons immunoprécipités avec des anticorps anti-méthyl-lysine (di ou tri-méthylées) afin de les analyser par spectrométrie de masse (**Figure 20**). Ainsi, nous pouvons différencier les protéines méthylées uniquement en présence de SETDB1 (protéines identifiées uniquement à travers les peptides contenant des lysines « légères ») des protéines méthylées indifféremment de la présence de SETDB1 (protéines identifiées à travers les peptides contenant des lysines « légères » et aussi dans ceux contenant des lysines « lourdes »).

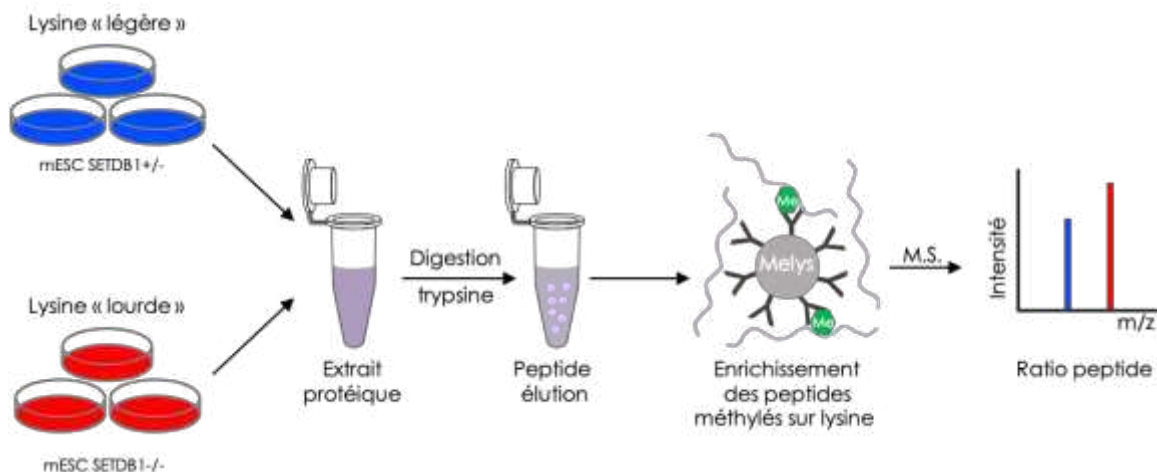


Figure 20 : Schéma du protocole de PTMScan couplé au SILAC et à la spectrométrie de masse.

Les cellules mESC sont cultivées dans un milieu spécifique contenant des lysines lourdes ou légères en fonction de la condition. Après culture, les protéines sont extraites, digérées et analysées par spectrométrie de masse. Grâce à la spectrométrie de masse nous pouvons alors dissocier les peptides selon le type de lysines et les associer aux conditions de culture.

Avant de réaliser la spectrométrie de masse, les protéines sont digérées avec la trypsine qui a pour particularité d'hydrolyser les liaisons peptidiques après les résidus lysine (K) ou arginine (R). Cependant, la méthylation sur lysine protège de la digestion (Rice et al., 1977), ce qui empêche les peptides méthylés d'être coupés au site de la méthylation, ils pourront donc être analysés par le spectromètre de masse (les peptides trop courts ne pourront pas être identifier en spectrométrie de masse). Les résultats de la spectrométrie sont ensuite présentés dans un tableau qui regroupe les peptides par site de méthylation et par niveau de méthylation et par une intensité dépendante de la charge (lourde (H) ou légère (L)) portée par la lysine. Nous avons réalisé le ratio d'intensité des peptides méthylés (pour les peptides méthylés sur lysine lourde ou légère et classé les peptides en fonction de ce ratio). Nous avons considéré de manière arbitraire que tous les peptides présentant un ratio strictement supérieur à 1,2 étaient méthylés uniquement en présence de SETDB1, les peptides ayant un ratio compris entre 0,8 et 1,2 sont méthylés indifféremment de la présence de SETDB1, et les peptides possédant un ratio strictement inférieur à 0,8 sont méthylés uniquement en absence de SETDB1. Plusieurs peptides pouvant appartenir à une même protéine, nous avons rassemblé tous les peptides en fonction des protéines auxquelles ils appartiennent. Nous avons résumé l'ensemble des données dans le tableau suivant (Table 2) :

Nombre de peptides	Nombre de protéines	Ratio correspondant
97	38	< 0,8
74	31	>0,8 et <1,2
56	29	>1,2

Table 2 : Tableau récapitulatif des résultats du PTMScan.

Les valeurs indiquent le nombre de peptides et de protéines identifiés, regroupés selon le ratio correspondant à l'intensité du résultat de spectrométrie de masse lysine lourde (*SETDB1+/+*) sur lysine légère (*SETDB1-/-*)

Nous nous sommes alors intéressés plus particulièrement aux protéines méthylées uniquement en présence de SETDB1 (celles présentant un ratio d'intensité supérieur à 1,2). Nous avons identifié 29 protéines dans ce groupe. A l'aide d'une

analyse STRING basée sur les interactions démontrées expérimentalement, identifiées dans les bases de données et grâce à la co-expression des protéines. Nous avons caractérisé un ensemble de protéines impliquées dans la traduction (**Figure 21A**), comme par exemple des facteurs d'élongation de la traduction (Eef1a2, Eef1a1, Eef2) impliqués dans la synthèse des protéines. Les autres protéines ne présentaient pas de liens particuliers entre elles (non montré sur le STRING). Nous avons poursuivi l'analyse sur cet ensemble de protéines (ratio >1,2) par une analyse d'ontologie et confirmé que la grande majorité des protéines méthylées uniquement en présence de SETDB1 sont impliquées dans la traduction (**Figure 21B**). Ces résultats ont été approfondis au laboratoire dans le cadre de la thèse de M^{me} Roberta Rapone, et ont donné lieu à un manuscrit sur le rôle de SETDB1 dans la traduction où SETDB1 est essentiel dans l'activité du complexe Trim71 pour son rôle dans le métabolisme des ARNm et dans la traduction (Rapone et al., 2022).

Cependant, dans notre recherche des potentielles cibles non histones de SETDB1, il s'avère que le PTMScan nous a donné des résultats peu satisfaisants quant au nombre de protéines identifiées. Ceci est probablement dû au fait que les anticorps anti-pan-méthyl-lysine n'aient pas une affinité suffisamment forte pour permettre une immunoprécipitation efficace. Nous avons donc choisi de réaliser une autre approche, qui est le MBT pull-down (détaillée ci-après).

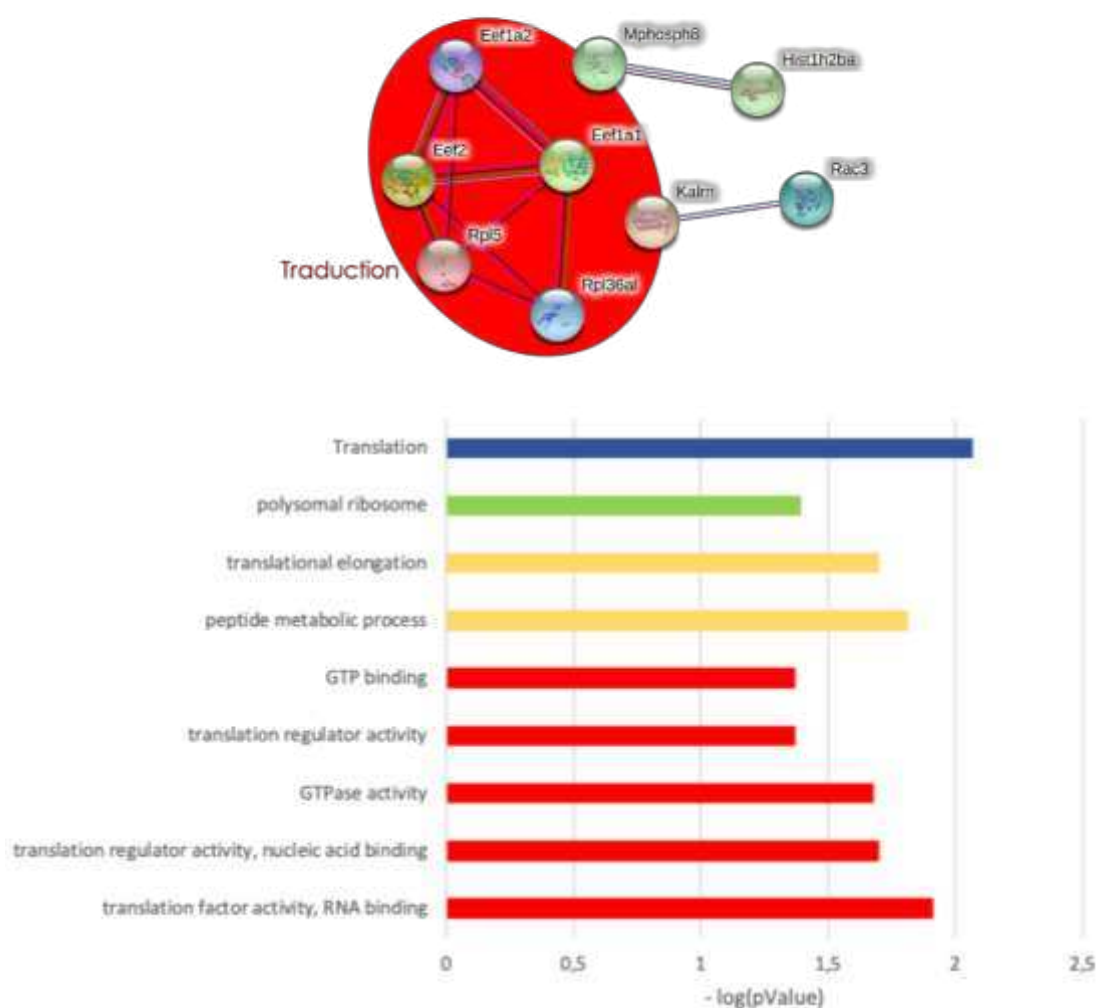


Figure 21 : Rôle des protéines méthylées par SETDB1 identifiées par PTMScan.

A. Analyse STRING des protéines méthylées en présence de SETDB1 (string-db.org). Le halo rouge représente les protéines ayant des fonctions dans la traduction des ARN messagers. B. Analyse d'ontologie des protéines à l'aide de *g:profiler*. Le bleu correspond à la base de données *Reactome*, le vert correspond au compartiment cellulaire, en rouge les fonctions moléculaires et en jaune les processus biologiques mis en jeu.

2. IDENTIFICATION DES CIBLES POTENTIELLES GRACE A LA METHODE DE MBT PULL-DOWN

La méthode de MBT pull-down est une méthode qui permet de précipiter des protéines méthylées sur lysine. Cette technique est basée sur la capacité de la protéine L3MBTL2 (Lethal (3) Malignant Brain Tumor-Like Protein 2) à reconnaître les lysines méthylées (mono- ou di-méthylées) indépendamment de la séquence d'acide

aminés. Pour réaliser le MBT pull-down, nous avons utilisé des fibroblastes embryonnaires des souris immortalisés (iMEF) hétérozygotes *SETDB1*^{+/-} ou KO pour *SETDB1* (*SETDB1*^{-/-}) (T. Matsui et al., 2010) pour lesquels nous avons réalisé des extraits protéiques nucléaire ou cytoplasmique (**Figure 22**).

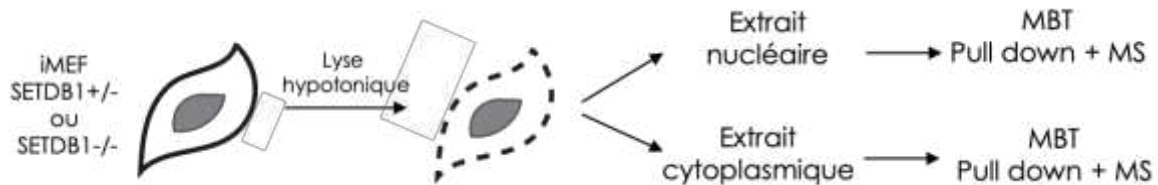


Figure 22 : Approche expérimentale du MBT pull-down couplé à la spectrométrie de masse.

Nous avons utilisé des iMEF que nous lysons afin de réaliser des extraits protéiques nucléaires ou cytoplasmiques avant de réaliser le MBT pull-down et l'analyse par spectrométrie de masse (MS).

Nous utilisons le domaine MBT fusionné à la GST (Glutathion S-Transférase) afin de réaliser une précipitation (pull-down) des protéines méthylées grâce à l'affinité du domaine MBT pour les lysines méthylées (**Figure 23A**) lié à la GST que nous allons précipiter avec des billes de glutathion. Il est important de préciser que lorsque nous réalisons ce type de pull-down, nous précipitons les protéines méthylées mais également les complexes dans lesquels elles sont impliquées.

Nous avons d'abord réalisé un pull-down GST et un pull-down GST-MBT et comparé à l'aide d'un SDS-PAGE coloré aux nitrates d'argent le profil et la quantité de protéines précipitées. La condition contrôle étant la condition GST seule. Nous remarquons tout d'abord que le protocole est fonctionnel car dans l'ensemble des conditions (*SETDB1*^{+/-} et *SETDB1*^{-/-}) nous précipitons des protéines (**Figure 23B**). De plus, nous remarquons sur les pistes GST, moins de protéines (protéines qui se lient de façon aspécifique à la GST ou aux billes agarose-glutathion) que sur les pistes GST-MBT (Figure 23B). Nous avons ensuite identifié l'ensemble de ces protéines par

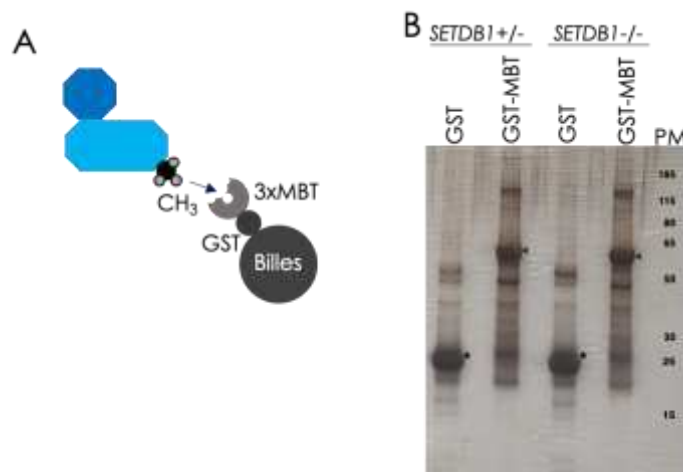


Figure 23 : Mise au point du MBT pull-down dans les iMEF.

A. Schéma explicatif du MBT pull-down. Les protéines méthylées sur lysine, seules ou en complexe, sont reconnues par le domaine MBT fusionné avec la GST. Cet ensemble est alors précipité grâce à des billes d'agarose couvertes de manière covalente avec du glutathion. B. Gel de SDS-PAGE coloré aux nitrates d'argent. Pour chaque condition nous avons comparé le profil de protéines précipitées avec seulement la GST (condition contrôle) et la GST-MBT à partir de cellules iMEF *SETDB1*^{+/-} ou *SETDB1*^{-/-}. Les têtes de flèches indiquent les protéines de fusion GST-MBT elles-mêmes et les astérisques indiquent les protéines GST seules.

spectrométrie de masse. Afin de faire une analyse la plus exhaustive possible, nous avons gardé l'ensemble des protéines identifiées même si seul un peptide de ces dernières est identifié par spectrométrie de masse.

2.1. Identification des substrats nucléaires non histones de SETDB1

A l'aide du MBT pull-down, nous avons tout d'abord pu mettre en évidence une liste de protéines nucléaire par spectrométrie de masse précipitées en présence ou en absence de SETDB1 dans les iMEF. La première chose que nous avons faite est d'éliminer les protéines identifiées dans la condition GST seule, considérant qu'elles sont retenues de façon non spécifique. Nous avons ensuite défini trois listes de protéines (**Figure 24**).

La première liste correspond aux protéines méthylées uniquement en présence de SETDB1 (protéines identifiées uniquement dans la condition *SETDB1+/-*).

La seconde liste correspond aux protéines méthylées uniquement en absence de SETDB1 (protéines identifiées uniquement dans la condition *SETDB1-/-*).

La troisième et dernière liste correspond aux protéines méthylées indépendamment de la présence de SETDB1 (protéines identifiées dans les deux conditions *SETDB1+/+* et *SETDB1-/-*).

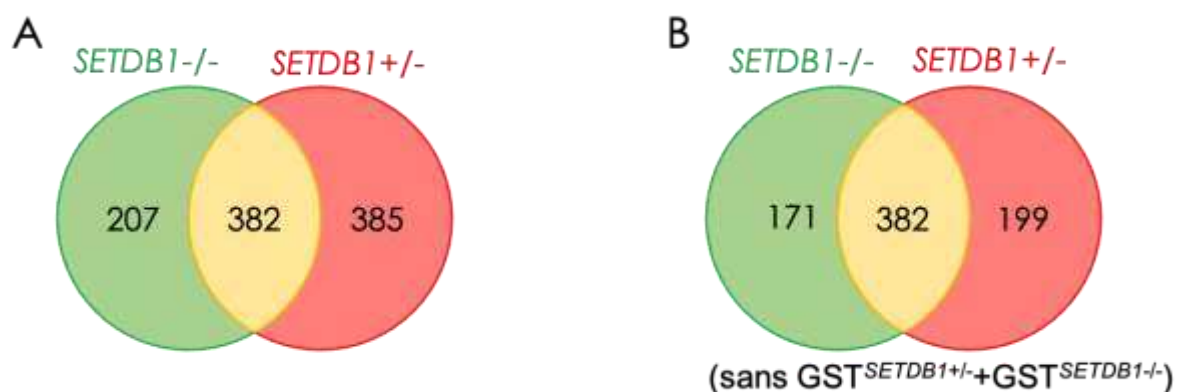


Figure 24 : Comparaison des groupes de protéines nucléaires précipitées par MBT pull-down dans les cellules iMEF *SETDB1+/-* vs *SETDB1-/-*.

A. Diagramme de Venn des groupes de protéines précipitées dans les cellules iMEF *SETDB1-/-* (en vert), *SETDB1+/-* (en rouge) et dans les deux conditions (en orange). B. Diagramme de Venn des groupes de protéines précipitées dans les cellules iMEFS *SETDB1-/-* (en vert), *SETDB1+/-* (en rouge) et dans les deux conditions (en orange) pour lesquelles nous avons éliminé l'ensemble des protéines précipitées uniquement par la GST.

Afin de vérifier si l'identification que nous avons faite donne des résultats probants, nous avons voulu confronter la liste des protéines trouvées avec les cribles déjà effectués pour identifier les protéines méthylées sur lysines. Moore et al. qui sont à l'origine de cette méthode (Moore et al., 2013), ont d'abord utilisé cette technique afin d'identifier de nouvelles cibles non histones de G9A (une autre H3K9 KMT, cf introduction). Ils ont alors développé cette approche qui s'avère être un outil assez puissant. Ils ont précipité les protéines par MBT pull-down à partir de cellules embryonnaires de rein humains (cellules 293T), ce qui peut représenter une source de différences dans les modifications post-traductionnelles des protéines en comparaison avec les fibroblastes de souris que nous avons utilisés (les méthylations

peuvent également être différentes d'un type cellulaire à l'autre ou bien en fonction de l'espèce), et ce n'est pas non plus la même enzyme (bien que cela n'impacte que les résultats spécifiques de l'enzyme) (**Figure 25A**). En parallèle, nous avons également comparé nos résultats avec la base de données de Cell Signaling Technology (CST) qui, à l'aide de leurs différents anticorps pan mono-méthyl-lysine, di-méthyl-lysine et tri-méthyl-lysine ont établi une liste de protéines méthylées par spectrométrie de masse après immunoprécipitation. Nous avons utilisé ces mêmes anticorps en western blot pour vérifier la méthylation sur lysine de certaines protéines, cf résultats partie 2). Contrairement à notre analyse de MBT pull-down, cette liste présente alors uniquement des protéines méthylées et non leurs partenaires (car l'immunoprécipitation est faite après la digestion à la trypsine, comme pour notre analyse PTM scan) (**Figure 25B**).

Ces différentes comparaisons nous ont permis de conclure, notamment parce que notre analyse a pu identifier des protéines communes avec les analyses de méthylome réalisées par CST et Moore et al., que le MBT pull-down est une méthode qui permet de correctement précipiter les protéines méthylées et nous avons obtenu un grand nombre de protéines.

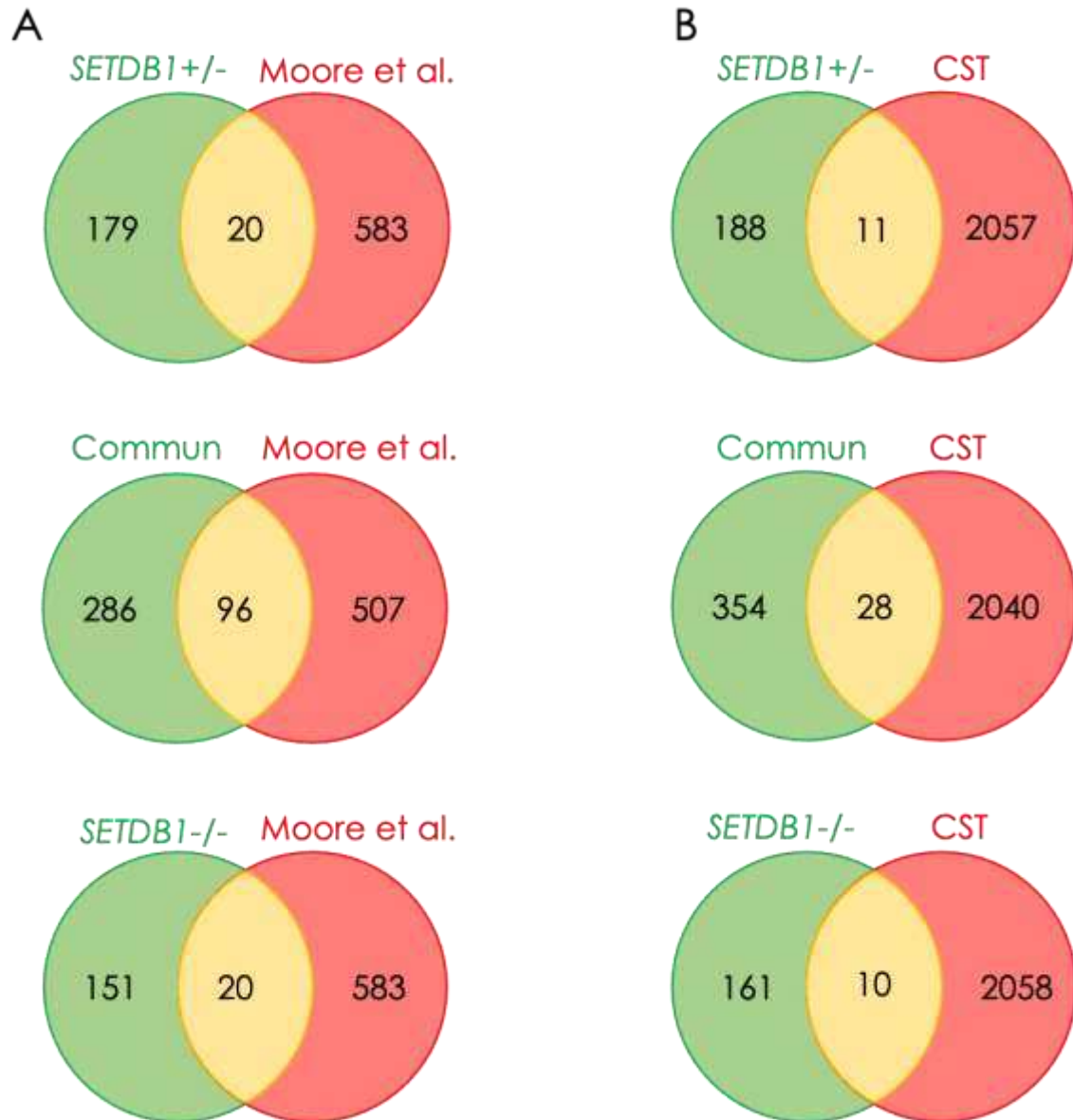


Figure 25 : Comparaison de nos résultats de MBT pull-down avec des données publiques. Diagramme de Venn des groupes de protéines précipitées : A. *haut* : dans les cellules iMEF *SETDB1+/-* (en vert), identifiées par Moore et al. (en rouge) et dans les deux expériences (en orange) ; *milieu* : pour les protéines précipitées indépendamment de la présence de SETDB1 (en vert), identifiées par Moore et al. (en rouge) et dans les deux expériences (en orange) ; *bas* : dans les cellules iMEF *SETDB1-/-* (en vert), identifiées par Moore et al. (en rouge) et dans les deux expériences (en orange). B. *haut* : dans protéines précipitées dans les cellules iMEF *SETDB1+/-* (en vert), présentes dans la base de données de protéines méthylées de Cell Signaling Technology (en rouge) et dans les deux expériences (en orange). ; *milieu* : pour les protéines précipitées indépendamment de la présence de SETDB1 (en vert), présentes dans la base de données de protéines méthylées de Cell Signaling (en rouge) et dans les deux expériences (en orange) ; *bas* : dans les cellules iMEF *SETDB1-/-*; présentes dans la base de données de protéines méthylées de Cell Signaling (en rouge) et dans les deux expériences (en orange).

Nous nous sommes, comme pour le PTMscan, intéressés plus précisément aux protéines méthylées uniquement en présence de SETDB1.

Pour cette liste de protéines, nous avons d'abord analysé les protéines par STRING en ne gardant que les interactions entre protéines montrées expérimentalement, en utilisant les bases de données et grâce à leur co-expression (comme pour le PTMscan). Grâce à cette analyse nous avons pu identifier trois groupes distincts de protéines.

Le premier groupe, renforce et confirme le résultat du PTMSCan en mettant en lumière un nombre important de protéines impliquées dans la traduction et sa régulation et dans la régulation des ARN en général (on retrouve ces protéines dans la fraction nucléaire notamment dû au fait que le réticulum endoplasmique est lié à l'enveloppe nucléaire et il « contamine » la fraction nucléaire (**Figure 26A**).

Le second groupe de protéines, est un groupe plus attendu de par la fonction première de SETDB1. En effet, ce groupe est un ensemble de protéines impliquées dans la régulation épigénétique et dans la transcription (**Figure 26A**). Cependant, il est intéressant de noter que dans ce groupe nous retrouvons de nombreuses protéines régulatrices qui ne sont pas des histones (Nous analysons la fraction nucléaire soluble, non chromatienne). Cela pourrait indiquer que SETDB1 pourrait, à travers des méthylations de cibles non histones, agir sur la régulation des gènes. Ce rôle a déjà été mis en évidence notamment sur le facteur de transcription UBF où la méthylation par SETDB1 réduit la transcription des ARNr (discuté dans l'introduction de ce manuscrit).

Le dernier groupe de protéines est celui sur lequel mon travail de thèse s'est concentré par la suite. En effet, ce groupe correspond aux protéines impliquées dans la régulation de la progression mitotique et la division cellulaire. On retrouve ces protéines dans la fraction nucléaire car l'organisation du matériel génétique pour la mitose se fait lorsque l'enveloppe nucléaire est encore présente (**Figure 26A**). Dans ce groupe, nous avons notamment identifié les complexes CPC (Aurora B et INCENP) et Condensine (Ncap-D2), importants dans la régulation aussi bien de la macro que de la micro-structure des chromosomes (**voir Résultats - deuxième partie**). D'ailleurs, il a récemment été montré l'importance de SETDB1 dans l'organisation de

la structure 3D de la chromatine au sein du noyau cellulaire et notre équipe vient de publier sur ce sujet dans le cancer du poumon (Zakharova et al., 2022).

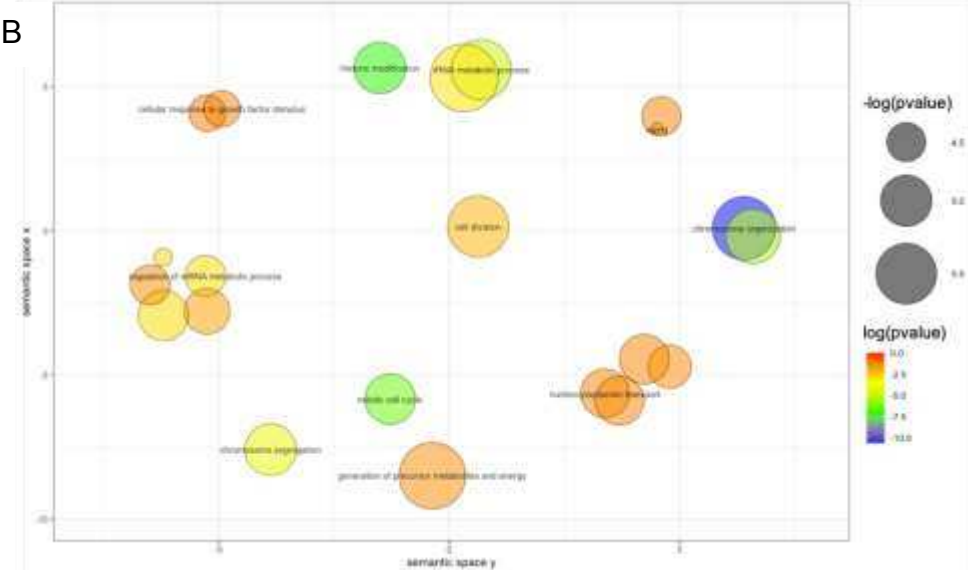
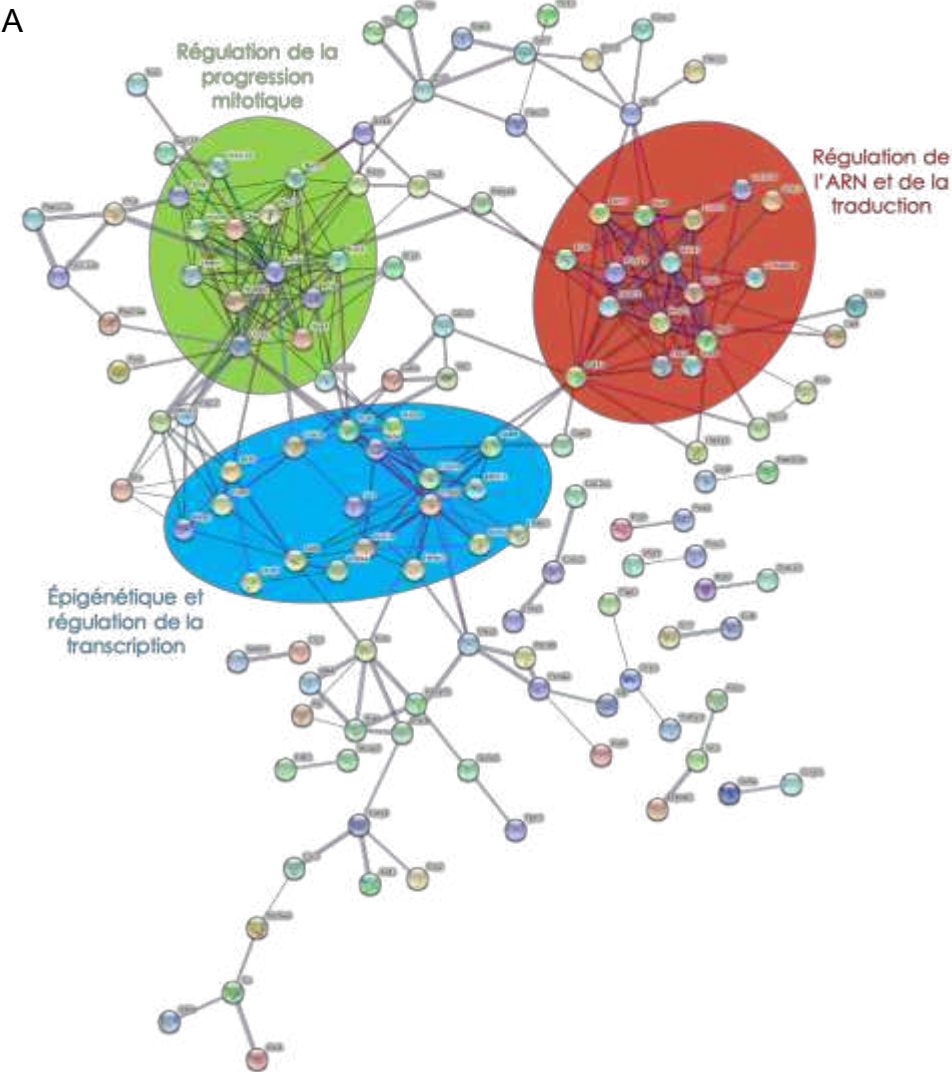


Figure 26 : Analyse fonctionnelle des potentielles cibles nucléaires de SETDB1. ↑

A. Analyse STRING des protéines nucléaires potentiellement méthylées par SETDB1 (string-db.org). Le halo rouge représente les protéines ayant des fonctions dans la régulation et la traduction et de l'ARN. Le halo bleu correspond aux protéines impliquées dans la régulation de la transcription et les processus épigénétiques. Le halo vert correspond aux protéines impliquées dans la progression de la mitose et sa régulation. B. Analyse d'ontologie des protéines à l'aide de *g:profiler*. Le graphique correspond à l'analyse avec l'outil Revigo des résultats donnés par *g:profiler*. Chaque groupe d'ontologie est rassemblé en fonction des processus impliqués et seul le nom du processus le plus significatif (log(pvalue) le plus élevé) est indiqué sur le graphe.

Après l'étude des protéines par analyse STRING, nous avons ensuite analysé les fonctions et les processus biologiques à l'aide d'une analyse ontologique dans lesquelles les protéines identifiées dans ce MBT pull-down sont impliquées.

Nous nous sommes là encore concentrés sur les protéines identifiées uniquement en présence de SETDB1. Cette analyse ontologique précise et complète l'analyse STRING car au-delà des complexes protéiques identifiés, nous pouvons également voir quels sont les processus dans lesquels ces complexes sont impliqués. Nous avons ainsi confirmé l'importance de SETDB1 dans l'organisation des chromosomes et la modification des histones (nous avons notamment pu identifier des HDAC). De plus, SETDB1 pourrait également, à travers la méthylation de cibles non histones, être clé dans la progression mitotique, la régulation du cycle cellulaire et la ségrégation des chromosomes. Dans cette analyse, nous retrouvons également l'impact que pourrait avoir SETDB1 dans la régulation de la traduction *via* son implication à travers la méthylation de protéines essentielles dans les processus métaboliques des ARN ribosomiaux et des ARN messagers (**Figure 26B**). En effet, le fait d'avoir identifié par MBT pull-down des protéines méthylées uniquement en présence de SETDB1 impliqués dans la régulation de la traduction, concorde avec les résultats du PTMScan. Ensemble, ces résultats indiquent que SETDB1 semble jouer un rôle dans la régulation de la synthèse des protéines. Nous avons identifié par exemple Eif3c, responsable de l'initiation de la traduction dans le MBT pull-down et des facteurs d'élongation de la traduction dans le PTMscan comme décrit précédemment. Il sera nécessaire de vérifier ces résultats par des analyses plus précises comme des western blot anti-méthyl lysine ou des tests de méthylation *in vitro*, afin de préciser quelles sont les protéines cibles directes de SETDB1 afin de pouvoir identifier un mécanisme d'action.

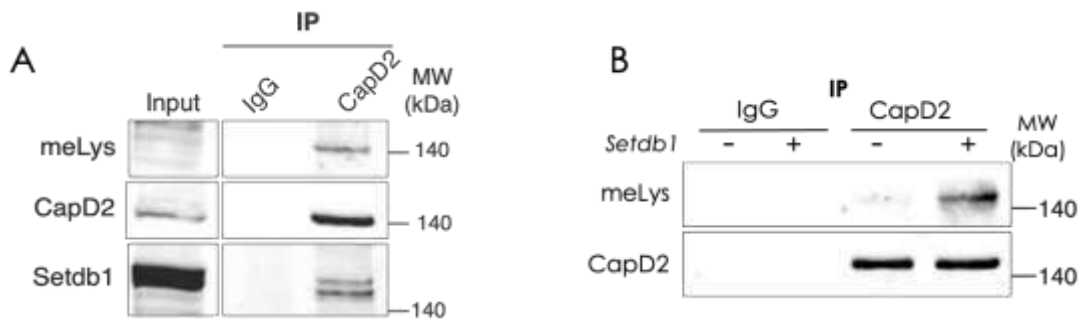


Figure 27 : CapD2 est méthylée dans les cellules mESC de façon dépendante de SETDB1. A. Western blot avec les anticorps pan-méthyl lysine, CapD2 et SETDB1 suite à l'immunoprécipitation de la protéine CapD2. La protéine CapD2 est méthylée et interagit avec SETDB1. B. Immunoprécipitation de la protéines CapD2 à partir de cellules iMEFSSETDB1+/- ou SETDB1-/- révélée à l'aide d'anticorps anti-CapD2 et anti-méthyl lysine. CapD2 semble être méthylée uniquement lorsque les cellules expriment SETDB1.

En complément, l'analyse ontologique a pu mettre en évidence que SETDB1 pourrait avoir un impact sur la réponse au stimuli des facteurs de croissance ainsi qu'un rôle dans le transport protéique noyau-cytoplasme. Ce résultat est très intéressant car notre laboratoire a mis en évidence que l'activation de la voie Wnt/beta caténine induit la relocalisation de SETDB1 au sein du cytoplasme. Par ailleurs, mon équipe d'accueil travaille en parallèle sur le rôle de SETDB1 dans la progression de la dystrophie musculaire de Duchenne *via* la dérégulation de la voie du TGF-beta qui donnera lieu là encore à une publication dans les prochaines années. A ce stade de l'étude, une des hypothèses principales est que SETDB1 pourrait potentiellement méthyler une protéine non histone impliquée dans cette voie comme par exemple les protéines Smad2/3. Dans le crible, on a identifié la protéine Thrombospondine 1 (qui peut être retenue dans le réticulum endoplasmique en cas de stress cellulaire (Lynch et al., 2012), membre de la voie de signalisation de la réponse au TGF-beta comme cible potentielle de SETDB1.

Nous avons, en parallèle, confirmé que la protéine CapD2, identifiée dans le MBT pull-down, et membre du complexe Condensine I est méthylée et interagit avec SETDB1 par co-immunoprécipitation (Figure 27A). Par la suite, nous avons pu montrer dans les mêmes lignées cellulaires (iMEF *SETDB1*+/- ou *SETDB1*-/-) que cette méthylation de CapD2 était dépendante de SETDB1 (**Figure 27B**). Je n'ai cependant pas approfondi le rôle de cette méthylation de CapD2.

2.2. Identification des cibles cytoplasmiques de SETDB1

La lysine méthyltransférase SETDB1 possède également une localisation cytoplasmique (cf introduction), le laboratoire a pu mettre en évidence que SETDB1 cytoplasmique garde son activité méthyltransférase. Dans le but de comprendre quel pourrait être le rôle de SETDB1 dans le cytoplasme, nous avons également réalisé le MBT pull-down dans le compartiment cytoplasmique de cellules iMEF et dans les mêmes conditions que dans le noyau (comme expliqué dans le chapitre précédent).

Dans la fraction cytoplasmique, nous avons pu identifier plus de 300 protéines potentiellement méthylées (encore une fois, les protéines précipitées sont, elles-mêmes méthylées ou sont dans un complexe avec une protéine méthylée). Là encore, nous avons comparé les protéines identifiées dans les différentes conditions (*SETDB1*^{+/-} vs *SETDB1*^{-/-}) (**Figure 28**) et trouvé près de 130 protéines potentiellement méthylées uniquement en présence de SETDB1.

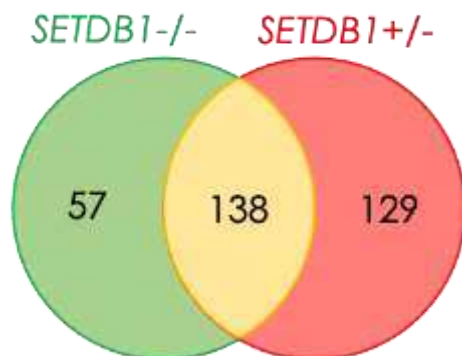


Figure 28 : Comparaison des groupes de protéines cytoplasmiques dans les cellules iMEF *SETDB1*^{+/-} vs *SETDB1*^{-/-}.

Diagramme de Venn des groupes de protéines précipitées par MBT pull-down dans les cellules iMEF *SETDB1*^{-/-} (en vert), *SETDB1*^{+/-} (en rouge) et dans les deux conditions (en orange).

De la même manière que pour l'analyse de la fraction nucléaire, nous avons d'abord procédé à une analyse STRING et identifié quatre sous-ensembles de protéines.

Le premier groupe de protéines correspond à des protéines impliquées dans la régulation de l'ARN. Ce résultat est consistant avec les résultats précédents et renforce le fait que SETDB1 joue un rôle potentiel dans la régulation de l'ARN à travers la méthylation de protéines non histones, au sein du cytoplasme mais également au sein du noyau (avec des protéines nucléaires ou cytoplasmiques potentiellement méthylées par SETDB1) (**Figure 29A**). En effet, nous retrouvons encore, comme lors

des deux précédentes analyses, des protéines impliquées dans la synthèse protéique tels que les facteurs d'initiations de la traduction comme Eif3c, Eif3a et Eif4g1.

Le second groupe de protéines identifiées correspond à un ensemble de protéines impliquées dans la régulation de la structure de cellule. Nous retrouvons notamment les sous-unités du complexe Spectrine (chaines alpha et beta) qui ont un rôle important dans le maintien de la stabilité mécanique de la cellule.

Dans le troisième groupe de protéines identifiées, nous retrouvons des protéines membres du protéasome comme les protéines Psmd1, Psma8 et Psme4. Toutes ces protéines sont impliquées dans la voie non canonique de NF- κ B jouant un rôle notamment dans la dégradation des protéines par le protéasome.

Pour finir, le dernier groupe de protéines identifiées est un groupe de protéines impliquées dans la progression et la régulation mitotique. Là encore, nous retrouvons des protéines ayant des fonctions similaires aux protéines identifiées dans le MBT pull-down nucléaire. Ces protéines sont notamment impliquées dans la régulation du complexe APC/C, avec l'ubiquitine ligase Ube2c ou membres des complexes Condensine I et II. Nous retrouvons notamment la protéine SMC2, membre des deux complexes Condensine, responsable de la compaction des chromosomes lors de la mitose.

Enfin, nous avons analysé l'ontologie de cet ensemble de protéines, et confirmé le résultat de l'analyse STRING, avec notamment des fonctions de régulation du cycle cellulaire et de la mitose (**Figure 29B**). Nous retrouvons également les protéines impliquées dans la structure des cellules et dans l'organisation du cytosquelette.

Pour conclure sur l'ensemble de ces analyses, nous avons identifié que SETDB1 pouvait avoir un grand nombre de cibles non histones potentielles, inconnues à ce jour. Ces cibles pourraient être impliquées dans différents processus cellulaires tels que la régulation de l'ARNm et la traduction ou bien la régulation mitotique. Nous avons pu définir des listes de protéines mais ce travail doit être complété par une analyse plus précise des protéines identifiées. En effet, comme expliqué

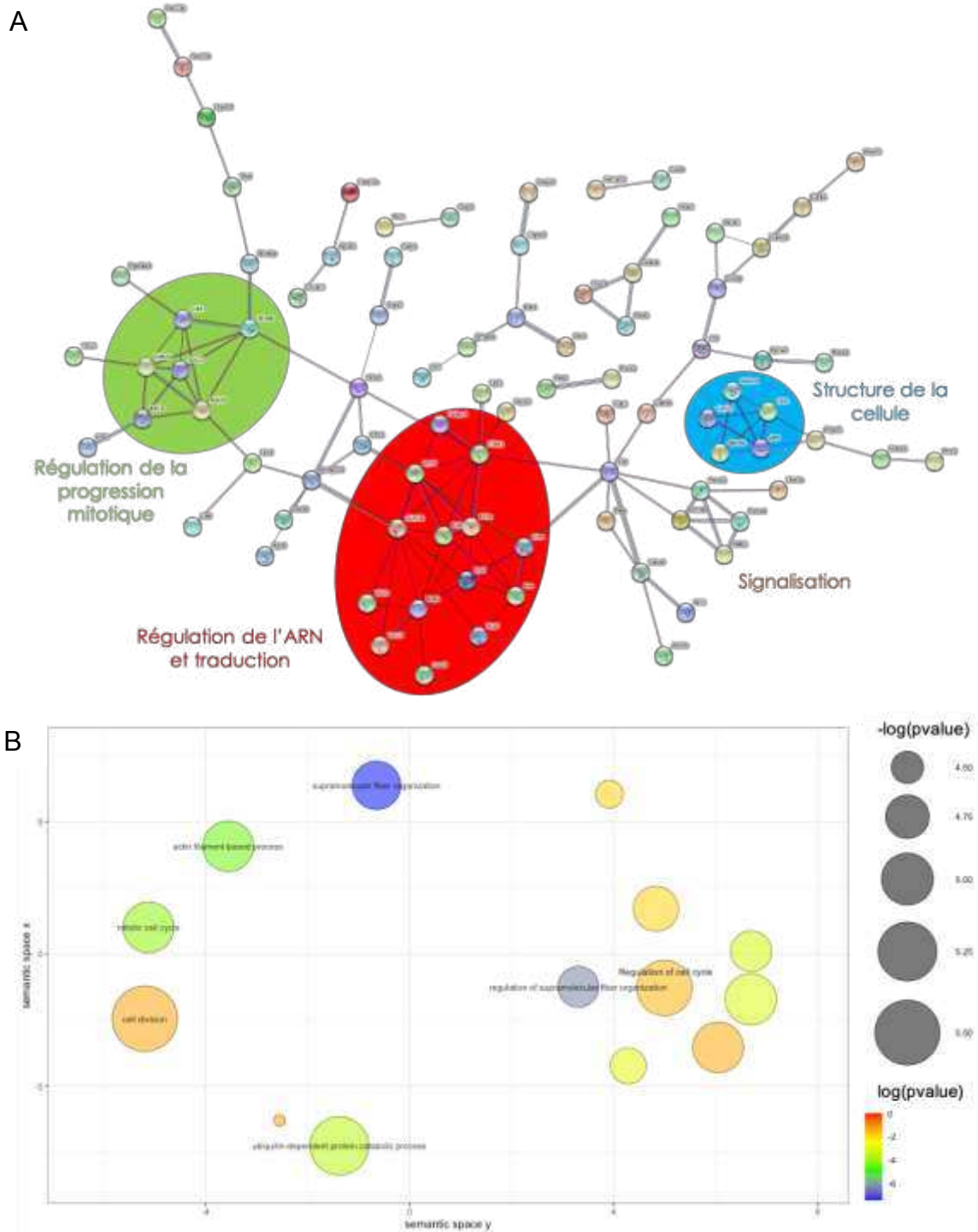


Figure 29 : Analyse fonctionnelle des potentielles cibles cytoplasmiques de SETDB1.

A. Analyse STRING des protéines cytoplasmiques potentiellement méthylées par SETDB1 (string-db.org). Le halo rouge représente les protéines ayant des fonctions dans la régulation et la traduction de l'ARN. Le halo bleu correspond aux protéines impliquées dans la structure et le squelette de la cellule. Le halo vert correspond aux protéines impliquées dans la progression de la mitose et sa régulation. B. Analyse en ontologie des protéines à l'aide de g:profiler. Le graphique correspond à l'analyse avec l'outil Revigo des résultats donnés par g:profiler. Chaque groupe d'ontologie est rassemblé en fonction des processus impliqués et seul le nom du processus le plus significatif ($\log(pvalue)$ le plus élevé) est indiqué sur le graphe.

précédemment, le MBT pull-down permet de précipiter des protéines méthylées sur lysine mais également leurs partenaires. Nous devons comme nous avons pu le faire pour la protéine CapD2, vérifier que les protéines identifiées sont effectivement méthylées à l'aide de western blot anti méthyl-lysine ou bien par tests de méthylation *in vitro*.

De plus, nous avons utilisé ces analyses pour définir des cibles potentielles mais nous avons gardé toutes les protéines identifiées par un seul et unique peptide. Nous pouvons par la suite restreindre le nombre de protéines pouvant effectivement être des cibles non histones de SETDB1 en rendant l'analyse plus stringente et en éliminant toutes les protéines identifiées par un seul peptide.

Pour la suite de mon travail doctoral, je me suis concentré sur l'implication de SETDB1 dans la progression mitotique et notamment montré que la protéine INCENP est une cible directe de SETDB1. Nous développerons ces travaux dans la partie suivante.

SETDB1 REGULATES MITOTIC PROGRESSION VIA DIRECT METHYLATION OF THE CHROMOSOME PASSENGER COMPLEX SUBUNIT INCENP

Gilles TELLIER¹, Ekaterina BOYARCHUK¹, Véronique JOLIOT¹, Laurence DEL MAESTRO¹ & Slimane AIT-SI-ALI^{1,2}.

¹ Université de Paris cité, CNRS, Epigenetics and Cell Fate, UMR7216, F-75013 Paris, France

² To whom correspondence should be addressed. Tel: +33-(0)1-5727-8919;
Fax: 33 (0)1 5727 8911; Email: slimane.aitsiali@u-paris.fr.

1. ABSTRACT

SETDB1 is a member of the SUV39 family of lysine methyltransferases (KMTs), which methylates lysine 9 of histone H3 (H3K9), a modification mainly involved in gene repression. A dysregulation of SETDB1 has been associated with tumorigenesis, in particular through its action on tumor suppressor genes, thus controlling cellular growth, invasiveness and migration. Beyond histones, SETDB1 methylates many non-histone substrates involved in tumorigenesis, such as p53, AKT and p63. Here, using proteomic assays, we have identified a significant set of proteins involved in mitosis and in the regulation of the macroscale chromosome organization, including the Chromosome Passenger Complex (CPC) subunits, as potential non-histone substrates of SETDB1. Further biochemical and enzymatic assays identified that SETDB1 interacts with and methylates the CPC subunit Inner Centromere Protein or INCENP on lysine 84 (K84). Overexpression of an INCENP-K84R mutant in cells has a strong negative transdominant effect and induced cell toxicity through mitotic defects such as binucleated cells or lagging chromosomes inducing micronuclei formation. We demonstrate that SETDB1 has an unexpected role in mitotic progression regulation *via* methylation of a non-histone substrate, suggesting that SETDB1 can impact cancer progression independently of its nuclear role in gene expression regulation through H3K9 methylation.

2. INTRODUCTION

SETDB1 is a lysine methyltransferase (KMT) belonging to the SUV39 subfamily, which methylates the lysine 9 of the histone H3 (H3K9), mainly involved in heterochromatin formation and gene repression (Schultz et al., 2002). All the members of the SUV39 family are dysregulated in many cancer types (V. K. Rao et al., 2017). *SETDB1* overexpression is a common feature in different cancers, such as lung (Rodriguez-Paredes et al., 2014), breast (Regina et al., 2016), melanoma (Ceol et al., 2011b), liver (Fei, Shang, et al., 2015) and colon cancers, favoring tumorigenesis. In colorectal cancer (CRC) SETDB1 is associated with a poor survival rate of patients and regulates CRC through the activation of the Wnt signaling, a pathway linked also to breast, prostate and lung cancer (N. Cao et al., 2020). SETDB1 is also responsible of the cancer proliferation rate increase during some anti-cancer drug therapy and depletion of SETDB1 could contribute to apoptosis (S. Ogawa et al., 2020).

SETDB1 catalyzes the three levels of H3K9 methylation promoting transcriptional repression (Seum et al., 2007). This process affects cancer progression through epigenetic silencing of tumor suppressor genes and modulation of signaling pathways controlling cell proliferation, migration and invasion (Yuqin Zhang et al., 2018). For example, increased level of SETDB1 has been shown to accelerate melanoma through dysregulation of *Hox* genes (Ceol et al., 2011a).

Beyond histones, all the members of the SUV39 family methylate many non-histone substrates and some are involved in tumorigenesis (V. K. Rao et al., 2017). SETDB1 participates in liver cancer cell growth *via* p53 methylation on K370, which increases TP53R249S (*Gain on function* p53 with oncogenic properties) stability (Fei, Shang, et al., 2015). In breast cancer the interaction between SETDB1 and p63 is essential for the stability of Np63 isoform (which is pro-oncogenic), and this promotes tumorigenesis (Regina et al., 2016). Finally, SETDB1 has been shown to methylate AKT, which promotes AKT kinase activity and oncogenic functions. SETDB1 downregulation reduces cancer cell growth *in vitro* and SETDB1 could be a potential therapeutic target in AKT-induced cancers (J. Guo et al., 2019).

Finally, *SETDB1* amplification is a common feature in lung cancer (Cruz-Tapias et al., 2019b; Rodriguez-Paredes et al., 2014; Zakharova et al., 2022). We and

others have performed analyses of transcriptomic data and found significant higher levels of *SETDB1* mRNA in cancer compared to non-cancerous control tissues associated with poor prognosis (Cruz-Tapias et al., 2019). This suggests that *SETDB1* expression levels could be used as a diagnostic biomarker and/or potentially as a therapeutic target in lung cancer. Moreover, we showed that SETDB1 inhibition in lung cancer cells attenuates the tumorigenic phenotype *in vitro* and *in vivo* (Zakharova et al., 2022).

Contrary to the other KMTs, which show only a nuclear localization, SETDB1 is mainly localized in the cytoplasm in several cell types (Beyer et al., 2016; Cho et al., 2013), however the functional meaning of SETDB1 cytoplasmic localization remains mainly elusive (Rapone et al., 2022).

In attempt to exhaustively identify the SETDB1-dependent lysine methylome in cells, we have used proteomic and *in vitro* methylation assays. We have identified a significant set of proteins involved in mitosis and also macroscale chromosome organization regulators as potential SETDB1 non-histone targets. We studied more specifically the Chromosome Passenger Complex (CPC), one of the main regulators complex during mitosis composed by the Aurora B kinase, the scaffolding protein INCENP and the localization module formed by Borealin and Survivin (Carmena et al., 2012). We found that SETDB1 methylates the murine CPC subunit INCENP on lysine 84. Overexpression of INCENP-K84R point mutant in the cells has a strong negative transdominant effect and induced cell death through mitotic defects such as DNA bridges and micronuclei formation. These data indicated a potential role of SETDB1 in the regulation of the cell fate at the non-chromatin level *via* the methylation of the CPC, in addition to H3K9 methylation at the chromatin level.

3. MATERIAL AND METHODS

Cell lines and cell culture

NIH3T3 (ATCC), NIH3T3 stably expressing H2B-GFP (a kind gift from David Lleres, Montpellier from IGMM), *SETDB1*^{+/-} and *SETDB1*^{-/-} iMEFs (a kind gift from Pr Yoichi Shinkai (T. Matsui et al., 2010)) were cultured in DMEM medium (Dulbecco's modified Eagle's medium) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) and 100 U/ml penicillin and 100 µg/ml streptomycin (Gibco) in a humid incubator at 37°C with 5% CO₂.

To generate stable cell lines, INCENPK84R-Myc or INCENPWT-Myc were cloned into Plvx-TetOn-Puro (Takara n°631847). NIH3T3 and NIH3T3-H2BGFP cells were transiently transduced with lentiviral particles produced in-house and selected using 0.2 µg/mL puromycin.

For transient transfection, we used the pcDNA5 (table 1) plasmid in which we cloned cDNA encoding INCENPK84R-Myc or INCENPWT-Myc. For transfection we used JetPEI kit (Polyplus) according to the manufacturer's protocol.

MBT pull-down

Plasmids were described by Or Gozani (GST-MBP) in pGEX6P-1 (ampicillin resistance-). Moore et al Mol Cell. 2013

To produce GST-MBP proteins, bacteria pellets (around 500µL) were resuspended in 3 ml of lysis buffer (PBS, 0.3% Triton X-100, protease inhibitor, 0,5 mg/ml of Lysozyme), incubated on ice for 30 min, then sonicated (Bioruptor, 0,5/0,5 s, high amplitude, 10 min). Lysate were cleared by centrifugation (16100 g) for 30 min. Glutathione-Sepharose (Sigma) was rehydrated and washed with washing buffer (PBS, 0.2% Triton X-100, 1 mM DTT). 300 µL of beads were incubated with bacterial extracts overnight at +4°C, then washed 3x10 min with washing buffer. Proteins were eluted for 10 min at RT in 500 µl of Elution buffer (100 mM Tris pH 8.0, 1 mM DTT, 15

mM glutathione (5 mg/ml stock). Glutathione was removed using Amicon Ultra centrifugal filters-10K (Millipore, UFC501096): Elution was loaded on the column centrifuged at 14,000 g for 15 min, then diluted with washing buffer up to 500 μ l, centrifuged again (repeat 2 times), diluted with 350 μ l transferred into new tubes.

500 μ g of cytoplasmic extracts were used for the pull-down using 25 μ l of solutions of bead coupled with GST, GST-MBT or 300 μ g of nuclear extracts were used for the pull-down using 25 μ l of solutions of bead coupled with GST or GST-MBT_WT. Extracts were diluted with 500 μ l of wash buffer (+ proteases inhibitors) and incubated with beads overnight at +4°C. Samples were washed with wash buffer for 5 min +4°C, tubes were changed, 2h wash at +4°C, 5x5min at RT. Elution with 30 μ l Elution buffer at RT mixed with 6 μ l LB & 3 μ l RA.

M.S. was performed by Ross Tomaino at Harvard Medical School in Taplin Mass Spectrometry Facility.

***In vitro* Methylation Assay**

GST fused INCENP proteins expression vectors were constructed through in frame cloning of INCENP coding regions produced by PCR using XhoI and NotI restriction sites of the pGex4T-3 vector. BL21DE3 bacteria were transformed with the various expression vectors (Table 1)., cultured in LB media + ampicillin at 30°C. GST-proteins expression was induced with IPTG (10 mM) for 16 h. GST-proteins were purified using glutathione-agarose beads, eluted with free glutathione in solution and quantified on gel.

For *in vitro* methylation test, 5 μ g of purified GST-INCENP proteins were incubated with 1 μ g Setdb1 (Active Motif, 31852) and radioactive methyl donor (tritiated SAM (S-adenosylmethionine), Perkin Elmer, NET155V250UC) in buffer (500 mM Tris-HCl pH 8.0, 50 % glycerol, 200 mM KCl, 50 mM MgCl₂, 10 mM DTT) at 37°C for 2 hours. After SDS-PAGE electrophoresis and Coomassie staining, the gel was dried and results revealed by autoradiography.

Protein extracts

For total extract, cells were lysed in RIPA buffer (150 mM NaCl, 1% Nonidet P-40, 0.5% Sodium-deoxycholate, 0.1% SDS, 50 mM Tris-HCl, pH 7.4) with protease and phosphatase inhibitors (Sigma, S8820 and P0044), incubated 30 min on ice, sonicated for 10 min (30 sec ON, 30 sec OFF) at medium frequency (Bioruptor Diagenode), and centrifugated at 16100 g for 10 min to keep supernatant. For cytoplasmic and nuclear fractionation, cells were lysed in (3 volume) buffer A (20 mM HEPES pH 7, 0,15 mM EDTA, 0,15 mM EGTA, 10 mM KCl, protease and phosphatase inhibitors and 0.15 mM spermine/ 0.5mM spermidine), 10% NP40 for 2 min on ice, supplemented with 8/9V of SR buffer (50 mM HEPES-KOH pH 7, 0,25 mM EDTA, 10 mM KCl, 70% (m/v) sucrose, protease and phosphatase inhibitors) and centrifuged at 2000 g for 5 min. Obtained supernatant was considered as cytoplasmic fraction. Nuclear pellets were resuspended in 1 volume low salt buffer (20 mM Tris-HCl pH 7.65; 0.2 mM EDTA; 25% glycerol; 150 mM NaCl, 1.5 mM MgCl₂) then supplemented drop-by drop by high salt buffer (20 mM Tris-HCl pH 7.65; 0,2 mM EDTA; 25% glycerol; 900 mM NaCl, 1,5 mM MgCl₂) to reach a final NaCl concentration of 300 mM. After 30 min of incubation on ice, extracts were supplemented with 1 mM CaCl₂ and treated with Micrococcal nuclease (0.0125 U/ml, Sigma) 10 minutes at 37°C. The reaction was stopped with EDTA at 4 mM final. Finally, sonication was performed for 10 min (30 sec ON, 30 sec OFF) at medium frequency (Bioruptor Diagenode). The nuclear and cytoplasmic fractions were ultra-centrifugated at 40000 rpm for 30 min and supernatant collected.

Co-immunoprecipitation

Protein extracts (1mg) were pre-cleared with protein G-agarose beads (G4510, Sigma) during 2h at 4°C, spin at 4°C for 10 min at 2000 g and supernatants were incubated with 5 µg of antibody overnight at 4°C. Ultralink A/G beads (Thermofisher, 88802) were blocked overnight at 4°C with 0.3 % BSA and 0.5 µg/µl ssDNA and then incubated with the immunocomplexes the next day for 2h at 4°C. Beads were washed 5 times with 1 mL of wash buffer (20 mM Tris-HCl, pH 7.0, 0.1

mM EDTA, 10% Glycerol, 150 mM NaCl, 0.01% NP-40) and eluted with 6 μ l loading buffer and 3 μ l reducing agent. Heat at 96°C for 5 min.

For immunoprecipitation using Myc-Trap technology, the Myc-Trap beads were equilibrated with wash buffer (10 mM Tris pH 7.5, 150 mM NaCl, 0,15 mM EDTA). Immunoprecipitations were carried out for 1 h to overnight at 4°C using 25 μ L of Myc-Trap bead slurry. The immunocomplexes were washed four times in wash buffer prior to elution with SDS-PAGE loading buffer.

Western blot

Total, nuclear or cytoplasmic protein extracts, or IP samples were prepared with NuPAGE 4X loading buffer (Life Technologies) and 10X reducing agent and heated at 96°C for 5 min. Separations of proteins were performed using pre-cast polyacrylamide gels (NuPAGE® Novex® 4-12% Bis-Tris) (Life technologies) and 1X NuPAGE MOPS SDS Running Buffer and transferred to nitrocellulose membranes in 20 mM phosphate transfer buffer (pH 6.7). Membranes were blocked in PBS supplemented with 0.1% Tween 20 and 5% non-fat dried milk and incubated with primary antibodies. Primary antibodies were detected with IRDYE- conjugated secondary antibodies and scanned on the LI-COR imaging system. Quantification of bands was performed with LI-COR software.

Table 1. Plasmids used in this study.

Plasmid	Comments
pGEX6P1-3xMBT	Addgene #46987
pMD2.G	Addgene #12259
psPAX2	Addgene #12260
pcDNA5	Invitrogene#V601020
pGex4T3	Amersham#28954552

Table 2. Antibodies used in this study

Name	Supplier	Application and dilution
Setdb1	Abcam, ab107225	WB (1 :1000),
c-Myc, clone 7E18	Sigma, ZRB1003	WB (1 :1000)
INCENP	Abcam, ab12183	WB (1 :1000), IP (5 µg)
Myc	ChromoteK, 9s1-100	WB (1 :1000), IF (1 :500)
CapD2	SC, sc-99217	WB (1 :1000), IP (5 µg)
di-methyl-lysine	CST, 14117	WB (1 :1000)
tri-methyl-lysine	CST,14680	WB (1 :1000)
Myc-Trap	ChromoteK-yma-20	N.A.
IgG mouse	Santa Cruz, sc-2025	IP (5 µg)
IgG rabbit	Santa Cruz, sc-2026	IP (5 µg)

4. RESULTS

4.1. The Chromosome Passenger Complex (CPC) subunits are enriched in the MBT pull-down assay in a SETDB1-dependent manner

To exhaustively identify the nuclear SETDB1-dependent lysine methylome, we used the MBT pull-down assay coupled with mass spectrometry (MS), which is based on the enrichment for methylated proteins using the L3MBTL1 protein domain that interacts with methylated lysines without sequence specificity (**Figure 1A**) (Carlson & Gozani, 2014; Moore et al., 2013). We have used iMEFs expressing or not SETDB1. The MBT pull-down results lead to the identification of lysine methylated proteins and/or proteins interacting with a lysine methylated protein in the presence or the absence of SETDB1.

Through this proteomic approach using MBT pull-down coupled with MS, we were able to identify 199 SETDB1 putative non-histone substrates (**Figure 1B**). Among which, many proteins involved in the regulation of the cell cycle and mitotic progression, in particular the Condensin (NcapD2), APC (Anapc2, Anapc10) and CPC (Aurora B, INCENP) complexes, as shown by a protein interactome analysis (**Figure 1C**). Moreover, when we further analyzed the roles of the proteins found as putative SETDB1 substrates, we found that most of them are involved in cell cycle progression (**Figure 1D**). Given that the MBT pull down precipitate partner and protein methylated, we verify of protein involved in mitosis progression are methylated.

4.2. SETDB1 methylates INCENP on lysine 84

INCENP (INner CENTromere Protein) is the scaffolding protein of the CPC complex on which the other proteins of the CPC complex are grafted. INCENP is composed of an N-ter domain that can interact with Tubulin. Upstream of this is the Borealin and Survivin interaction domain, which is also identified as a centromere targeting domain (Adams et al., 2000a; Cooke et al., 1987). INCENP also has a heterochromatin protein (HP1) binding domain, important for its interphase localization (Kang et al., 2011). The HP1 protein is involved in chromatin compaction because, once methylated, it is able to recruit SUV39H1 (Festenstein et al., 2003) (**Figure 2A**).

INCENP is listed to be methylated on lysine in the phosphosite.org database. We tested if SETDB1 interacts with INCENP by co-immunoprecipitation assays. Our results showed that SETDB1 interacts with INCENP subunit (**Figure 2B**). Interestingly, by combining co-immunoprecipitation with INCENP antibodies and western blotting using a mix of anti-di and tri methyl-lysine antibodies, we confirmed that endogenous INCENP is methylated on lysine(s) and interacts with SETDB1 in MEFs (**Figure 2B**). This result suggested that INCENP could be a direct methylation substrate of SETDB1. To confirm this hypothesis, we used active recombinant SETDB1 to perform *in vitro* methylation assay.

In order to identify the SETDB1-methylated lysines on INCENP, we have performed *in vitro* methylation assay with active recombinant SETDB1 using as substrates GST-fused INCENP protein fragments produced in bacteria. The goal was to first identify the INCENP domains that can be methylated by SETDB1. However, some INCENP fragments were toxic in bacteria or were not soluble, which was also the case for the full length INCENP protein (not shown). We therefore constructed new INCENP deletion mutants of about 200 amino acids, which were not toxic, cover almost all the INCENP full length and we successfully produced them.

A first *in vitro* radioactive methylation assay showed that the 1-150 fragment is methylated by SETDB1 (**Figure 2B**). This result confirmed that INCENP can be methylated by SETDB1, which supports the previous finding regarding the INCENP-SETDB1 interaction and the INCENP lysine methylation (WB lysine methyl) (**Figure 2B**).

We further fragmented the INCENP 1-150 region which contains 10 lysines into smaller fragments (still fused to GST like above) in order to separate the different lysines. Thus, divided it into 3 fragments: 1-46 (3 lysines), 47-80 (4 lysines) and 80-150 (3 lysines) (**Figure 2C**). Thanks to the *in vitro* methylation assay, we have identified that the lysine(s) methylated by SETDB1 are within the 80-150 fragment of INCENP (Figure 2C), which hosts three lysines. We have next mutated these lysines into arginines in order to identify if they are methylated *in vitro* (**Figure 2D**). Doing this, we observed an important decrease in methylation by SETDB1 for the INCENP 80-150 fragment mutated on lysine K84 (**Figure 2D**).

Together, these results allowed us to highlight SETDB1 methylates the INCENP CPC subunit on lysine 84.

4.3. INCENP K84R mutant is cytotoxic and induces DNA bridges

To test whether the INCENP lysine K84 could be important in the biological functions of INCENP, we generated an INCENP K84R mutant in which the lysine is replaced by an arginine to retain the positive charge of the residue. We constructed eukaryotic expression vectors encoding Myc-tagged wild-type (WT) or the K84R mutant forms of INCENP. We transiently transfected these vectors in asynchronous NIH3T3 cells.

We first observed after the first transfection of INCENP K84R mutant that the expression of this mutant induced cell death. Thus, we decided to quantify by IF against Myc to follow the Myc-positive cells at 8 and 24 hours post-transfection. While at 8h we found about 68% of WT and 57% of K83R mutant cells positive cells, at 24h post-transfection we observed a 5-fold decrease in cells expressing the K83R mutant (12%) but not the WT INCENP (61%) (**Figure 3A**). This result suggested that the expression of the INCENP K84R mutant impacts cell survival and therefore that the K84 lysine on INCENP is required for its biological functions, probably during mitosis.

Since INCENP, as part of CPC, is involved in proper attachment of microtubules to chromosomes during mitosis and regulation of cytokinesis, we carefully observed mitotic figures and dividing cells (Adams et al., 2000). We observed that the cells transfected with INCENP-K84R show DNA bridges between daughter cells (**Figure 3B**), which could result from improper attachment of microtubules to the centromeres.

Taken together, these results suggested that INCENP-K84R might have a cytotoxic effect as a dominant negative mutant, probably through the alteration of chromosome segregation.

4.4. INCENP K84R mutation did not impact the CPC integrity

Because of the apparent and early cytotoxic effect of INCENP-K84R (few hours post-transfection, **Figure 3A**), and in order to finely characterize the biological

phenotype of the cells expressing INCENP-K84R, we established an inducible expression system. To this end, we constructed lentiviral vectors expressing Myc-tagged WT and K84R INCENP versions, where the expression is under the control of a doxycycline (Dox). We used these vectors to generate NIH3T3 stable cell lines in which we can control the expression of these INCENP versions.

We have first asked whether the INCENP K84R mutant might impact the CPC integrity. To this end, we used the inducible NIH3T3 cell lines for the expression of INCENP K84R-Myc and INCENP WT-Myc, and performed co-immunoprecipitations to verify the integrity of the CPC complex. After induction with doxycycline of the cell lines overnight (16h) we carried out total protein extractions followed by co-immunoprecipitation using the Myc-trap system allowing us to precipitate the Myc- WT and myc-K84R INCENP, thus selecting only the exogenous forms (endogenous INCENP it still express). We then checked the co-immunoprecipitation of the CPC subunits, Aurora B, Borealin and Survivin. Our results indicated that the CPC subunits interacted with an apparent similar affinity with both WT and K84R mutant INCENP forms (**Figure 4**). This suggested that the K84R mutation on the INCENP protein does not drastically modify the integrity of the CPC complex and that the mitosis defects observed are not due to complex formation defects but to INCENP post-translational modification defects and its dynamic.

This result showed that lysine K84 of INCENP is essential for the “correct” mitotic progression through its post-translational modifications probably through its SETDB1-mediated methylation.

4.5. INCENP K84R mutant induce micronuclei and binucleated cells

We used these stable NIH3T3 cell lines to further analyze chromosome segregation upon expression of WT or K84R INCENP. First, we checked the level of expression of the mutant INCENP K84R or WT INCENP after induction (**Figure 5A**). We quantified the phenotypes consistent with a defect in the CPC functions like micronuclei formation or binucleated cells (**Figure 5B**). CPC is essential for microtubule kinetochore attachment which leads to have a good sisters chromatids

repartition. CPC is also essential to cytokinesis and the furrow ingression. We therefore quantified the cells showing an appearance of micronuclei and counted the binucleated cells after 16h of induction with doxycycline of the stable lines NIH3T3 expressing WT or K84R INCENP. We observed an 8-fold increase (up to 8%) of cells with micronuclei when the expression of the INCENP K84R mutant is induced compared to non-induced cells or compared to cells expressing WT INCENP (**Figure 5C**). In the same way, the number of binucleated cells increased up to 2% for the cells (48-fold) expressing the INCENP K84R mutant in comparison with the non-induced cells or with the cells expressing the WT INCENP form (**Figure 5D**). These phenotypes are consistent with mitosis defects and more particularly with the appearance of latent chromosomes and DNA bridges between the two daughter cells at the end of mitosis (**Figure 3B**).

These data suggested that CPC function are impact when we express INCENP K84R methylation mutant. INCENP methylation on this lysine seems to have an essential role at the end of mitosis.

4.6. Lagging chromosomes in anaphase with INCENP K84R induction

To better understand the mitosis dynamics that can explain the defects observed previously (**Figure 3**) and in order to study more finely the role of lysine K84 integrity and of its possible methylation during mitosis, we have generated a system of stable and inducible expression of WT or K84R INCENP proteins, as previously, but in NIH3T3 cells that stably express histone H2B fused to GFP which will allow us to follow DNA segregation.

Using this system, we were able to set up a monitor to follow mitosis by video-microscopy. The videos were monitored overnight (12h), with an image taken every 3 minutes. Using these videos, we quantified the number of mitoses presenting latent chromosomes during anaphase in cells expressing WT or mutant INCENP forms (**Figure 6A-B, complete video in Supplemental video**). We observed more almost 70%, a 10-fold increase, of mitosis presenting latent chromosomes in anaphase after induction of the expression of the INCENP K84R mutant form but not in INCENP WT (around 7%) (**Figure 6C**). In many cases the latent chromosomes have no impact on the fate of mitosis but, as shown above, they increase the probability of the appearance of micronuclei or binucleated cells.

These various observations point towards a potential role of the methylation of INCENP K84 in the chromosomal separation during anaphase.

5. DISCUSSION

SETDB1 is an essential epigenetic regulator of chromatin dynamics and gene expression within the nucleus through H3K9 methylation. SETDB1 is a lysine methyltransferase that also exhibits cytoplasmic localization and appears to have functions within the cytoplasm (Beyer et al., 2016; Rapone et al., 2022). We therefore attempted to discover new non-histone substrates for SETDB1. We were able through proteomic approaches to identify potential substrates particularly involved in cell cycle regulation, such as the INCENP protein, a main subunit of the CPC complex, which is essential during mitosis for proper chromosome separation. We therefore attempted to determine the potential role of INCENP methylated lysine by SETDB1 during mitosis.

The CPC is important throughout mitosis. CPC involvement begins at the prophase during which it participates in chromosome condensation. CPC is then located at the level of the centromeres where it allows the attachment of mitotic spindles to the kinetochore. This step is important to have a faithful distribution of sister chromatids between the two daughter cells. At the onset of anaphase, the CPC will detach from the chromosomes and remains localized in the center of the dividing cell. During cytokinesis, CPC will form the so-called midbody, located between the two daughter cells (Y. Abe et al., 2016; Carmena et al., 2012).

Our results should make it possible to characterize the role of INCENP K84 lysine which can be methylated by SETDB1 in the separation of chromosomes during cell division, which is essential for cell proliferation and plays a key role in cancerous transformation through INCENP methylation.

In this study, we found that SETDB1 can methylate INCENP K84 lysine and a replacement of this lysine by an arginine has an impact on mitosis. Indeed, we showed that INCENP K84R induces lagging chromosomes in anaphase, which can give rise to micro or poly-nucleated cells. Indeed, we observed a significant increase of cells with micronuclei and binucleated cells for the cells expressing the INCENP K84R mutant. We have mainly assessed the importance of the INCENP K84 lysine (methylated by SETDB1). For further analyses of the role of this methylation the next steps should be to develop a way to analyze INCENP by mass spectrometry and to highlight the level

of methylation of lysine 84 and design specific antibodies against INCENP K84 methylation (mono-, di-, tri).

INCENP methylation can have an impact on protein binding such as HP1. Indeed, HP1 methyl-phospho switch is a mechanism which is well known on H3K9/S10 residue. HP1 can bind H3K9me3 and it will be release from the chromatin by the phosphorylation of H3S10 (Fischle et al., 2005). Since INCENP is able to interact with HP1 and the dynamics of binding is important for mitotic progression, we propose that this methylation can have an impact on this dynamic. Despite the fact that there is no serine around lysine K84, there is serine S94 which can be phosphorylated and which is close to HP1 binding site (start at AA 100). For further studies, it would be interesting to check these dynamics following the methylation state along mitosis.

In summary, our study is part of a new trend in the field of epigenetics, that is focusing on the identification of non-histone substrates of enzymes at first identified as modifying only histones. Indeed, our studies are beginning to highlight the role of these enzymes in many pathophysiological mechanisms. In the case of SETDB1, some non-histone targets have already been discovered, three of which are involved in pathologies. Among these targets, there is for example, the transcription factor p53 (Fei, Shang, et al., 2015), the viral protein Tat (Van Duyne et al., 2008), the transcription factor UBF (Hwang et al., 2014) and a cell cycle regulatory protein ING2 (by an unknown mechanism) (Sun et al., 2014). These discoveries demonstrate the importance of the study of non-histone substrates of so-called "histone" methyltransferase enzymes in basic research but also in the understanding and treatment of various diseases. Indeed, mitosis is a key process for the cell and it really important to the genomic conservation. Mitotic defects can induce like in our case, a loss of DNA which is highly toxic for the cells. In our case, this is of particular interest in the mechanisms of cancer because, if the role of SETDB1 in the expression of genes in a cancerous context (melanoma) has already been demonstrated (Ceol et al., 2011a), the role of SETDB1 in mitotic progression through the INCENP methylation could help to understand new mechanisms in the aberrant cell growth of cancer cells.

6. REFERENCES

- Abe, S., Nagasaka, K., Hirayama, Y., Kozuka-Hata, H., Oyama, M., Aoyagi, Y., Obuse, C., & Hirota, T. (2011). The initial phase of chromosome condensation requires Cdk1-mediated phosphorylation of the CAP-D3 subunit of condensin II. *Genes & Development*, 25(8), 863–874. <https://doi.org/10.1101/GAD.2016411>
- Abe, Y., Sako, K., Takagaki, K., Hirayama, Y., Uchida, K. S. K., Herman, J. A., DeLuca, J. G., & Hirota, T. (2016). HP1-Assisted Aurora B Kinase Activity Prevents Chromosome Segregation Errors. *Developmental Cell*, 36(5), 487–497. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2016.02.008>
- Adams, R. R., Wheatley, S. P., Gouldsworthy, A. M., Kandels-Lewis, S. E., Carmena, M., Smythe, C., Gerloff, D. L., & Earnshaw, W. C. (2000a). INCENP binds the Aurora-related kinase AIRK2 and is required to target it to chromosomes, the central spindle and cleavage furrow. *Current Biology*, 10(17), 1075–1078. [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(00\)00673-4](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(00)00673-4)
- Adams, R. R., Wheatley, S. P., Gouldsworthy, A. M., Kandels-Lewis, S. E., Carmena, M., Smythe, C., Gerloff, D. L., & Earnshaw, W. C. (2000b). INCENP binds the Aurora-related kinase AIRK2 and is required to target it to chromosomes, the central spindle and cleavage furrow. *Curr. Biol.*, 10(17), 1075–1078. [https://doi.org/10.1016/s0960-9822\(00\)00673-4](https://doi.org/10.1016/s0960-9822(00)00673-4)
- Addi, C., Presle, A., Frémont, S., Cuvelier, F., Rocancourt, M., Milin, F., Schmutz, S., Chamot-Rooke, J., Douché, T., Duchateau, M., Gai Gianetto, Q., Salles, A., Ménager, H., Matondo, M., Zimmermann, P., Gupta-Rossi, N., & Echard, A. (2020). The Flemmingsome reveals an ESCRT-to-membrane coupling via ALIX/syntenin/syndecan-4 required for completion of cytokinesis. *Nature Communications*, 11(1). <https://doi.org/10.1038/S41467-020-15205-Z>
- Ainsztein, A. M., Kandels-Lewis, S. E., Mackay, A. M., & Earnshaw, W. C. (1998). INCENP centromere and spindle targeting: Identification of essential conserved motifs and involvement of heterochromatin protein HP1. *Journal of Cell Biology*, 143(7), 1763–1774. <https://doi.org/10.1083/jcb.143.7.1763>
- Ait-Si-Ali, S., Guasconi, V., Fritsch, L., Yahi, H., Sekhri, R., Naguibneva, I., Robin, P., Cabon, F., Polesskaya, A., & Harel-Bellan, A. (2004). A Suv39h-dependent mechanism for silencing S-phase genes in differentiating but not in cycling cells. *The EMBO Journal*, 23(3), 605. <https://doi.org/10.1038/SJ.EMBOJ.7600074>
- ALLFREY, V. G., FAULKNER, R., & MIRSKY, A. E. (1964). ACETYLATION AND METHYLATION OF HISTONES AND THEIR POSSIBLE ROLE IN THE. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States Of*, 51, 786–794. <https://doi.org/10.1073/PNAS.51.5.786/ASSET/8C54DEE7-DD18-4CC2-86A1-BD41B3751D13/ASSETS/PNAS.51.5.786.FP.PNG>
- Alushin, G. M., Ramey, V. H., Pasqualato, S., Ball, D. A., Grigorieff, N., Musacchio, A., & Nogales, E. (2010). The Ndc80 kinetochore complex forms oligomeric arrays

- along microtubules. *Nature* 2010 467:7317, 467(7317), 805–810. <https://doi.org/10.1038/nature09423>
- Ambler, R. P., & Rees, M. W. (1959). Epsilon-N-Methyl-lysine in bacterial flagellar protein. *Nature*, 184(4679), 56–57. <https://doi.org/10.1038/184056B0>
- Ambrosini, G., Adida, C., & Altieri, D. C. (1997). A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma. *Nature Med.*, 3(8), 917–921. <https://doi.org/10.1038/nm0897-917>
- Bannister, A. J., & Kouzarides, T. (1996). The CBP co-activator is a histone acetyltransferase. *Nature* 1996 384:6610, 384(6610), 641–643. <https://doi.org/10.1038/384641a0>
- Bannister, A. J., & Kouzarides, T. (2011). Regulation of chromatin by histone modifications. *Cell Research*, 21(3), 381–395. <https://doi.org/10.1038/CR.2011.22>
- Batham, J., Lim, P. S., & Rao, S. (2019). SETDB-1: A potential epigenetic regulator in breast cancer metastasis. In *Cancers* (Vol. 11, Issue 8). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/cancers11081143>
- Bazile, F., St-Pierre, J., & D'Amours, D. (2010). Three-step model for condensin activation during mitotic chromosome condensation. <Http://Dx.Doi.Org/10.4161/Cc.9.16.12620>, 9(16), 3263–3275. <https://doi.org/10.4161/CC.9.16.12620>
- Beyer, S., Pontis, J., Schirwis, E., Battisti, V., Rudolf, A., Le Grand, F., & Ait-Si-Ali, S. (2016). Canonical Wnt signalling regulates nuclear export of Setdb1 during skeletal muscle terminal differentiation. *Cell Discovery*, 2, 16037. <https://doi.org/10.1038/celldisc.2016.37>
- Bilodeau, S., Kagey, M. H., Frampton, G. M., Rahl, P. B., & Young, R. A. (2009). SetDB1 contributes to repression of genes encoding developmental regulators and maintenance of ES cell state. *Genes & Development*, 23(21), 2484–2489. <https://doi.org/10.1101/GAD.1837309>
- Blanc, R. S., & phane Richard, S. (2017). Molecular Cell Review Arginine Methylation: The Coming of Age. *Molecular Cell*, 65, 8–24. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2016.11.003>
- Brosh, R., & Rotter, V. (2009). When mutants gain new powers: news from the mutant p53 field. *Nature Reviews. Cancer*, 9(10), 701–713. <https://doi.org/10.1038/NRC2693>
- Brotelle, T., & Bay, J. O. (2016). La voie de signalisation PI3K-AKT-mTOR : description, développement thérapeutique, résistances, marqueurs prédictifs/pronostiques et applications thérapeutiques en cancérologie. *Bulletin Du Cancer*, 103(1), 18–29. <https://doi.org/10.1016/J.BULCAN.2015.09.011>

- Bulut-Karslioglu, A., DeLaRosa-Velázquez, I. A., Ramirez, F., Barenboim, M., Onishi-Seebacher, M., Arand, J., Galán, C., Winter, G. E., Engist, B., Gerle, B., O'Sullivan, R. J., Martens, J. H. A., Walter, J., Manke, T., Lachner, M., & Jenuwein, T. (2014). Suv39h-Dependent H3K9me3 Marks Intact Retrotransposons and Silences LINE Elements in Mouse Embryonic Stem Cells. *Molecular Cell*, *55*(2), 277–290. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2014.05.029>
- Callebaut, I., & Mornon, J. P. (1997). The human EBNA-2 coactivator p100: multidomain organization and relationship to the staphylococcal nuclease fold and to the tudor protein involved in *Drosophila melanogaster* development. *Biochem. J*, *321*, 125–132.
- Cao, N., Yu, Y., Zhu, H., Chen, M., Chen, P., Zhuo, M., Mao, Y., Li, L., Zhao, Q., Wu, M., & Ye, M. (2020). SETDB1 promotes the progression of colorectal cancer via epigenetically silencing p21 expression. *Cell Death and Disease*, *11*(5), 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41419-020-2561-6>
- Cao, R., Tsukada, Y. I., & Zhang, Y. (2005). Role of Bmi-1 and Ring1A in H2A ubiquitylation and Hox gene silencing. *Molecular Cell*, *20*(6), 845–854. <https://doi.org/10.1016/J.MOLCEL.2005.12.002>
- Capalbo, L., Montembault, E., Takeda, T., Bassi, Z. I., Glover, D. M., & D'Avino, P. P. (2012). The chromosomal passenger complex controls the function of ESCRT-III Snf7 proteins during cytokinesis. *Open Biology*, *2*(MAY), 120070. <https://doi.org/10.1098/rsob.120070>
- Cardoso, M. C., Leonhardt, H., & Nadal-Ginard, B. (1993). Reversal of terminal differentiation and control of DNA replication: Cyclin A and cdk2 specifically localize at subnuclear sites of DNA replication. *Cell*, *74*(6), 979–992. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(93\)90721-2](https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90721-2)
- Carlson, S. M., & Gozani, O. (2014). Emerging technologies to map the protein methylome. In *Journal of Molecular Biology* (Vol. 426, Issue 20, pp. 3350–3362). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2014.04.024>
- Carmena, M., Ruchaud, S., & Earnshaw, W. C. (2009). Making the Auroras glow: regulation of Aurora A and B kinase function by interacting proteins. *Curr. Opin. Cell Biol.*, *21*(6), 796–805. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2009.09.008>
- Carmena, M., Wheelock, M., Funabiki, H., & Earnshaw, W. C. (2012). The chromosomal passenger complex (CPC): from easy rider to the godfather of mitosis. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, *13*(12), 789–803. <https://doi.org/10.1038/nrm3474>
- Castro, A., Bernis, C., Vigneron, S., Labbé, J. C., & Lorca, T. (2005). The anaphase-promoting complex: a key factor in the regulation of cell cycle. *Oncogene 2005* *24*:3, *24*(3), 314–325. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1207973>
- Ceol, C. J., Houvras, Y., Jane-Valbuena, J., Bilodeau, S., Orlando, D. A., Battisti, V., Fritsch, L., Lin, W. M., Hollmann, T. J., Ferré, F., Bourque, C., Burke, C. J., Turner,

- L., Uong, A., Johnson, L. A., Beroukhir, R., Mermel, C. H., Loda, M., Ait-Si-Ali, S., ... Zon, L. I. (2011a). The histone methyltransferase SETDB1 is recurrently amplified in melanoma and accelerates its onset. *Nature*, *471*(7339), 513–517. <https://doi.org/10.1038/nature09806>
- Ceol, C. J., Houvras, Y., Jane-Valbuena, J., Bilodeau, S., Orlando, D. A., Battisti, V., Fritsch, L., Lin, W. M., Hollmann, T. J., Ferré, F., Bourque, C., Burke, C. J., Turner, L., Uong, A., Johnson, L. A., Beroukhir, R., Mermel, C. H., Loda, M., Ait-Si-Ali, S., ... Zon, L. I. (2011b). The histone methyltransferase SETDB1 is recurrently amplified in melanoma and accelerates its onset. *Nature*, *471*(7339), 513–518. <https://doi.org/10.1038/nature09806>
- Chait, B. T. (2006). Mass spectrometry: Bottom-up or top-down? *Science*, *314*(5796), 65–66. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1133987/ASSET/E04ACFC3-A074-4381-9FC0-A0B841C07D7D/ASSETS/SCIENCE.1133987.FP.PNG>
- Chang, C. Te, Hautbergue, G. M., Walsh, M. J., Viphakone, N., Van Dijk, T. B., Philipsen, S., & Wilson, S. A. (2013). Chtop is a component of the dynamic TREX mRNA export complex. *The EMBO Journal*, *32*(3), 473–486. <https://doi.org/10.1038/EMBOJ.2012.342>
- Cheeseman, I. M., Chappie, J. S., Wilson-Kubalek, E. M., & Desai, A. (2006). The conserved KMN network constitutes the core microtubule-binding site of the kinetochore. *Cell*, *127*(5), 983–997. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2006.09.039>
- Chen, R. H., Waters, J. C., Salmon, E. D., & Murray, A. W. (1996). Association of Spindle Assembly Checkpoint Component XMAP215 with Unattached Kinetochores. *Science*, *274*(5285), 242–246. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.274.5285.242>
- Cheng, L., Zhang, J., Ahmad, S., Rozier, L., Yu, H., Deng, H., & Mao, Y. (2011). Aurora B regulates formin mDia3 in achieving metaphase chromosome alignment. *Developmental Cell*, *20*(3), 342–352. <https://doi.org/10.1016/J.DEVCEL.2011.01.008>
- Cho, S., Park, J. S., & Kang, Y. K. (2013). Regulated nuclear entry of over-expressed Setdb1. *Genes to Cells*, *18*(8), 694–703. <https://doi.org/10.1111/gtc.12068>
- Cobbe, N., & Heck, M. M. S. (2000). Review: SMCs in the world of chromosome biology- from prokaryotes to higher eukaryotes. *Journal of Structural Biology*, *129*(2–3), 123–143. <https://doi.org/10.1006/JSBI.2000.4255>
- Cobbe, N., & Heck, M. M. S. (2004). The evolution of SMC proteins: phylogenetic analysis and structural implications. *Molecular Biology and Evolution*, *21*(2), 332–347. <https://doi.org/10.1093/MOLBEV/MSH023>
- Connell, C. M., Colnaghi, R., & Wheatley, S. P. (2008). Nuclear survivin has reduced stability and is not cytoprotective. *J. Biol. Chem.*, *283*(6), 3289–3296. <https://doi.org/10.1074/jbc.m704461200>
- Cooke, C. A., Heck, M. M. S., & Earnshaw, W. C. (1987). The inner centromere protein

- (INCENP) antigens: movement from inner centromere to midbody during mitosis. *J. Cell Biol.*, 105(5), 2053–2067. <https://doi.org/10.1083/jcb.105.5.2053>
- Corces, V. G. (2014). *Architectural proteins : regulators of 3D genome organization in cell fate*. 24(11), 703–711. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2014.08.003>
- Courtheoux, T., Enchev, R. I., Lampert, F., Gerez, J., Beck, J., Picotti, P., Sumara, I., & Peter, M. (2016). Cortical dynamics during cell motility are regulated by CRL3KLHL21 E3 ubiquitin ligase. *Nature Communications* 2016 7:1, 7(1), 1–13. <https://doi.org/10.1038/ncomms12810>
- Cruz-Tapias, P., Zakharova, V., Perez-Fernandez, O. M., Mantilla, W., Ramírez-Clavijo, S., & Ait-Si-Ali, S. (2019a). Expression of the major and pro-oncogenic H3K9 lysine methyltransferase SETDB1 in non-small cell lung cancer. *Cancers*, 11(8), 1134. <https://doi.org/10.3390/cancers11081134>
- Cruz-Tapias, P., Zakharova, V., Perez-Fernandez, O., Mantilla, W., Ramírez-Clavijo, S., & Ait-Si-Ali, S. (2019b). Expression of the Major and Pro-Oncogenic H3K9 Lysine Methyltransferase SETDB1 in Non-Small Cell Lung Cancer. *Cancers*, 11(8), 1134. <https://doi.org/10.3390/cancers11081134>
- Cuellar, L., Herzner, A. M., Zhang, X., Goyal, Y., Watanabe, C., Friedman, B. A., Janakiraman, V., Durinck, S., Stinson, J., Arnott, D., Cheung, T. K., Chaudhuri, S., Modrusan, Z., Doerr, J. M., Classon, M., & Haley, B. (2017). Silencing of retrotransposons by SETDB1 inhibits the interferon response in acute myeloid leukemia. *Journal of Cell Biology*, 216(11), 3535–3549. <https://doi.org/10.1083/jcb.201612160>
- Czvitkovich, S., Sauer, S., Peters, A. H. F. M., Deiner, E., Wolf, A., Laible, G., Opravil, S., Beug, H., & Jenuwein, T. (2001). Over-expression of the SUV39H1 histone methyltransferase induces altered proliferation and differentiation in transgenic mice. *Mechanisms of Development*, 107(1–2), 141–153. [https://doi.org/10.1016/S0925-4773\(01\)00464-6](https://doi.org/10.1016/S0925-4773(01)00464-6)
- Da Fonseca, P. C. A., Kong, E. H., Zhang, Z., Schreiber, A., Williams, M. A., Morris, E. P., & Barford, D. (2010). Structures of APC/CCdh1 with substrates identify Cdh1 and Apc10 as the D-box co-receptor. *Nature* 2010 470:7333, 470(7333), 274–278. <https://doi.org/10.1038/nature09625>
- Dai, J., Sultan, S., Taylor, S. S., & Higgins, J. M. G. (2005). The kinase haspin is required for mitotic histone H3 Thr 3 phosphorylation and normal metaphase chromosome alignment. *Genes & Development*, 19(4), 472–488. <https://doi.org/10.1101/GAD.1267105>
- Deng, X., von Keudell, G., Suzuki, T., Dohmae, N., Nakakido, M., Piao, L., Yoshioka, Y., Nakamura, Y., & Hamamoto, R. (2015). PRMT1 promotes mitosis of cancer cells through arginine methylation of INCENP. *Oncotarget*, 6(34), 35173–35182. <https://doi.org/10.18632/ONCOTARGET.6050>
- Deniz, Ö., de la Rica, L., Cheng, K. C. L., Spensberger, D., & Branco, M. R. (2018).

- SETDB1 prevents TET2-dependent activation of IAP retroelements in naïve embryonic stem cells. *Genome Biology*, 19(1). <https://doi.org/10.1186/S13059-017-1376-Y>
- Dillon, S. C., Zhang, X., Trievel, R. C., & Cheng, X. (2005). *The SET-domain protein superfamily: protein lysine methyltransferases*. <https://doi.org/10.1186/gb-2005-6-8-227>
- Dodge, J. E., Kang, Y.-K., Beppu, H., Lei, H., & Li, E. (2004). Histone H3-K9 methyltransferase ESET is essential for early development. *Molecular and Cellular Biology*, 24(6), 2478–2486. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14993285>
- Douglas, M. E., Davies, T., Joseph, N., & Mishima, M. (2010). Aurora B and 14-3-3 coordinately regulate clustering of centralspindlin during cytokinesis. *Current Biology: CB*, 20(10), 927–933. <https://doi.org/10.1016/J.CUB.2010.03.055>
- Drechsel, E. (1889). Zur Kenntniss der Spaltungsprodukte des Caseïns. *Journal Für Praktische Chemie*, 39(1), 425–429. <https://doi.org/10.1002/PRAC.18890390135>
- Dürr, H., Flaus, A., Owen-Hughes, T., & Hopfner, K. P. (2006). Snf2 family ATPases and DExx box helicases: differences and unifying concepts from high-resolution crystal structures. *Nucleic Acids Research*, 34(15), 4160. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKL540>
- Eissenberg, J. C., & Shilatifard, A. (2010). Histone H3 lysine 4 (H3K4) methylation in development and differentiation. *Developmental Biology*, 339(2), 240–249. <https://doi.org/10.1016/J.YDBIO.2009.08.017>
- Elgin, S. C. R., & Reuter, G. (2013). Position-Effect Variegation, Heterochromatin Formation, and Gene Silencing in *Drosophila*. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 5(8). <https://doi.org/10.1101/CSHPERSPECT.A017780>
- Epsztejn-Litman, S., Feldman, N., Abu-Remaileh, M., Shufaro, Y., Gerson, A., Ueda, J., Deplus, R., Fuks, F., Shinkai, Y., Cedar, H., & Bergman, Y. (2008). De novo DNA methylation promoted by G9a prevents reprogramming of embryonically silenced genes. *Nature Structural & Molecular Biology* 2008 15:11, 15(11), 1176–1183. <https://doi.org/10.1038/nsmb.1476>
- Estève, P. O., Hang, G. C., Smallwood, A., Feehery, G. R., Gangisetty, O., Karpf, A. R., Carey, M. F., & Pradhan, S. (2006). Direct interaction between DNMT1 and G9a coordinates DNA and histone methylation during replication. *Genes & Development*, 20(22), 3089–3103. <https://doi.org/10.1101/GAD.1463706>
- Falnes, P., Jakobsson, M. E., Davydova, E., Ho, A., & Malecki, J. (2016). Protein lysine methylation by seven- β -strand methyltransferases. *The Biochemical Journal*, 473(14), 1995–2009. <https://doi.org/10.1042/BCJ20160117>
- Fei, Q., Shang, K., Zhang, J., Chuai, S., Kong, D., Zhou, T., Fu, S., Liang, Y., Li, C., Chen, Z., Zhao, Y., Yu, Z., Huang, Z., Hu, M., Ying, H., Chen, Z., Zhang, Y., Xing,

- F., Zhu, J., ... Shou, J. (2015). Histone methyltransferase SETDB1 regulates liver cancer cell growth through methylation of P53. *Nature Communications*, 6(1), 1–12. <https://doi.org/10.1038/ncomms9651>
- Fei, Q., Yang, X., Jiang, H., Wang, Q., Yu, Y., Yu, Y., Yi, W., Zhou, S., Chen, T., Lu, C., Atadja, P., Liu, X. S., Li, E., Zhang, Y., & Shou, J. (2015). SETDB1 modulates PRC2 activity at developmental genes independently of H3K9 trimethylation in mouse ES cells. *Genome Research*, 25(9), 1325–1335. <https://doi.org/10.1101/GR.177576.114>
- Feldman, N., Gerson, A., Fang, J., Li, E., Zhang, Y., Shinkai, Y., Cedar, H., & Bergman, Y. (2006). G9a-mediated irreversible epigenetic inactivation of Oct-3/4 during early embryogenesis. *Nature Cell Biology* 2006 8:2, 8(2), 188–194. <https://doi.org/10.1038/ncb1353>
- Feng, Q., Wang, H., Ng, H. H., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Struhl, K., & Zhang, Y. (2002). Methylation of H3-Lysine 79 Is Mediated by a New Family of HMTases without a SET Domain. *Current Biology*, 12(12), 1052–1058. [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(02\)00901-6](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(02)00901-6)
- Festenstein, R., Pagakis, S. N., Hiragami, K., Lyon, D., Verreault, A., Sekkali, B., & Kioussis, D. (2003). Modulation of heterochromatin protein 1 dynamics in primary Mammalian cells. *Science (New York, N.Y.)*, 299(5607), 719–721. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1078694>
- Fischle, W., Tseng, B. S., Dormann, H. L., Ueberheide, B. M., Garcia, B. A., Shabanowitz, J., Hunt, D. F., Funabiki, H., & Allis, C. D. (2005). Regulation of HP1 – chromatin binding by histone H3 methylation and phosphorylation. *Nature*, 438(December). <https://doi.org/10.1038/nature04219>
- Flemming, W. (1891). Attraktionssphären und Zentralkörperchen in Gewebs- und Wanderzellen. *Anat. Anz.*, 6, 78–86.
- Fritsch, L., Robin, P., Mathieu, J. R. R., Souidi, M., Hinaux, H., Rougeulle, C., Harel-Bellan, A., Ameyar-Zazoua, M., & Ait-Si-Ali, S. (2010). A Subset of the Histone H3 Lysine 9 Methyltransferases Suv39h1, G9a, GLP, and SETDB1 Participate in a Multimeric Complex. *Molecular Cell*, 37(1), 46–56. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2009.12.017>
- Gall, S. M. L., Bobé, P., Reiss, K., Horiuchi, K., Niu, X. Da, Lundell, D., Gibb, D. R., Conrad, D., Saftig, P., & Blobel, C. P. (2009). Nbl1p: a Borealin/Dasra/CSC-1-like protein essential for Aurora/Ipl1 complex function and integrity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Biol. Cell*, 20(6), 1772–1784. <https://doi.org/10.1091/mbc.e08-10-1011>
- Gassmann, R., Carvalho, A., Henzing, A. J., Ruchaud, S., Hudson, D. F., Honda, R., Nigg, E. A., Gerloff, D. L., & Earnshaw, W. C. (2004). Borealin: a novel chromosomal passenger required for stability of the bipolar mitotic spindle. *J. Cell Biol.*, 166(2), 179–191. <https://doi.org/10.1083/jcb.200404001>

- Gautier, J., Norbury, C., Lohka, M., Nurse, P., & Maller, J. (1988). Purified maturation-promoting factor contains the product of a *Xenopus* homolog of the fission yeast cell cycle control gene *cdc2+*. *Cell*, *54*(3), 433–439. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(88\)90206-1](https://doi.org/10.1016/0092-8674(88)90206-1)
- Gehani, S. S., Agrawal-Singh, S., Dietrich, N., Christophersen, N. S., Helin, K., & Hansen, K. (2010). Polycomb Group Protein Displacement and Gene Activation through MSK-Dependent H3K27me3S28 Phosphorylation. *Molecular Cell*, *39*(6), 886–900. <https://doi.org/10.1016/J.MOLCEL.2010.08.020>
- Gerlich, D., Hirota, T., Koch, B., Peters, J. M., & Ellenberg, J. (2006). Condensin I Stabilizes Chromosomes Mechanically through a Dynamic Interaction in Live Cells. *Current Biology*, *16*(4), 333–344. <https://doi.org/10.1016/J.CUB.2005.12.040>
- Glover, D. M., Leibowitz, M. H., McLean, D. A., & Parry, H. (1995). Mutations in aurora prevent centrosome separation leading to the formation of monopolar spindles. *Cell*, *81*(1), 95–105. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(95\)90374-7](https://doi.org/10.1016/0092-8674(95)90374-7)
- Goldknopf, R. L., Goldberg, I. L., Busch, D. A., Ballal, H., & Kang, N. R. (1975). Isolation and characterization of protein A24, a “histone-like” non-histone chromosomal protein. *Journal of Biological Chemistry*, *250*(18), 7182–7187. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)40926-5](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)40926-5)
- Grana, X., & Reddy, E. P. (1995). *Cell cycle control in mammalian cells: Role of cyclins, cyclin dependent kinases (CDKs), growth suppressor genes and cyclin-dependent kinase inhibitors (CKIs)*. <https://www.researchgate.net/publication/15575285>
- Green, L. C., Kalitsis, P., Chang, T. M., Cipetic, M., Kim, J. H., Marshall, O., Turnbull, L., Whitchurch, C. B., Vagnarelli, P., Samejima, K., Earnshaw, W. C., Choo, K. H. A., & Hudson, D. F. (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.097790/258379/AM/CONTRASTING-ROLES-OF-CONDENSIN-I-AND-II-IN-MITOTIC>
- Greer, E. L., & Shi, Y. (2012). Histone methylation: A dynamic mark in health, disease and inheritance. In *Nature Reviews Genetics* (Vol. 13, Issue 5, pp. 343–357). <https://doi.org/10.1038/nrg3173>
- Grewal, S. I. S., & Elgin, S. C. R. (2002). Heterochromatin: new possibilities for the inheritance of structure. *Current Opinion in Genetics & Development*, *12*(2), 178–187. [https://doi.org/10.1016/S0959-437X\(02\)00284-8](https://doi.org/10.1016/S0959-437X(02)00284-8)
- Grossman, S. R. (2001). p300/CBP/p53 interaction and regulation of the p53 response. *European Journal of Biochemistry*, *268*(10), 2773–2778. <https://doi.org/10.1046/J.1432-1327.2001.02226.X>
- Grunstein, M. (1997). Histone acetylation in chromatin structure and transcription. *Nature* *1997* *389*:6649, *389*(6649), 349–352. <https://doi.org/10.1038/38664>

- Guasconi, V., Pritchard, L. L., Fritsch, L., Mesner, L. D., Francastel, C., Harel-Bellan, A., & Ait-Si-Ali, S. (2010). Preferential association of irreversibly silenced E2F-target genes with pericentromeric heterochromatin in differentiated muscle cells. *Epigenetics*, 5(8), 704–709. <https://doi.org/10.4161/EPI.5.8.13025>
- Guo, J., Dai, X., Laurent, B., Zheng, N., Gan, W., Zhang, J., Guo, A., Yuan, M., Liu, P., Asara, J. M., Toker, A., Shi, Y., Pandolfi, P. P., & Wei, W. (2019). AKT methylation by SETDB1 promotes AKT kinase activity and oncogenic functions. *Nature Cell Biology*, 21(2), 226–237. <https://doi.org/10.1038/s41556-018-0261-6>
- Guo, Y., Zhao, S., & Wang, G. G. (2021). Polycomb gene silencing mechanisms: PRC2 chromatin targeting, H3K27me3 “readout” and phase separation-based compaction HHS Public Access. *Trends Genet*, 37(6), 547–565. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2020.12.006>
- Gyory, I., Wu, J., Fejér, G., Seto, E., & Wright, K. L. (2004). PRDI-BF1 recruits the histone H3 methyltransferase G9a in transcriptional silencing. *Nature Immunology* 2004 5:3, 5(3), 299–308. <https://doi.org/10.1038/ni1046>
- Hames, R. S., Wattam, S. L., Yamano, H., Bacchieri, R., & Fry, A. M. (2001). APC/C-mediated destruction of the centrosomal kinase Nek2A occurs in early mitosis and depends upon a cyclin A-type D-box. *The EMBO Journal*, 20(24), 7117–7127. <https://doi.org/10.1093/EMBOJ/20.24.7117>
- Heald, R., & McKeon, F. (1990). Mutations of phosphorylation sites in lamin A that prevent nuclear lamina disassembly in mitosis. *Cell*, 61(4), 579–589. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(90\)90470-Y](https://doi.org/10.1016/0092-8674(90)90470-Y)
- Hempel, K., Lange, H. W., & Birkofer, L. (1968). ε-N-Trimethyllysin, eine neue Aminosäure in Histonen. *Naturwissenschaften* 1968 55:1, 55(1), 37–37. <https://doi.org/10.1007/BF00593411>
- Henry, R. A., Kuo, Y. M., & Andrews, A. J. (2013). Differences in specificity and selectivity between CBP and p300 acetylation of histone H3 and H3/H4. *Biochemistry*, 52(34), 5746–5759. https://doi.org/10.1021/BI400684Q/SUPPL_FILE/BI400684Q_SI_001.PDF
- Hindriksen, S., Meppelink, A., & Lens, S. M. A. (2015). Functionality of the chromosomal passenger complex in cancer. *Biochemical Society Transactions*, 43(1), 23–32. <https://doi.org/10.1042/BST20140275>
- Hiragami, K., & Festenstein, R. (2005). Heterochromatin protein 1: a pervasive controlling influence. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS* 2005 62:23, 62(23), 2711–2726. <https://doi.org/10.1007/S00018-005-5287-9>
- Hirano, T. (2012). Condensins: universal organizers of chromosomes with diverse functions. *Genes & Development*, 1659–1678. <https://doi.org/10.1101/gad.194746.112.GENES>
- Hirano, T. (2016). Condensin-Based Chromosome Organization from Bacteria to

- Vertebrates. *Cell*, 164(5), 847–857. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2016.01.033>
- Hirano, T., & Mitchison, T. J. (1994). A heterodimeric coiled-coil protein required for mitotic chromosome condensation in vitro. *Cell*, 79(3), 449–458. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(94\)90254-2](https://doi.org/10.1016/0092-8674(94)90254-2)
- Hirota, T., Gerlich, D., Koch, B., Ellenberg, J., & Peters, J. M. (2004). Distinct functions of condensin I and II in mitotic chromosome assembly. *Journal of Cell Science*, 117(26), 6435–6445. <https://doi.org/10.1242/JCS.01604>
- Hirota, T., Lipp, J. J., Toh, B. H., & Peters, J. M. (2005). Histone H3 serine 10 phosphorylation by Aurora B causes HP1 dissociation from heterochromatin. *Nature* 2005 438:7071, 438(7071), 1176–1180. <https://doi.org/10.1038/nature04254>
- Honda, R., Ko, R., Nigg, E. A., & Synchronization, C. (2003). *Exploring the Functional Interactions between Aurora B , INCENP , and Survivin in Mitosis*. 14(August), 3325–3341. <https://doi.org/10.1091/mbc.E02>
- Hsu, I. C., Metcalf, R. A., Sun, T., Welsh, J. A., Wang, N. J., & Harris, C. C. (1991). Mutational hotspot in the p53 gene in human hepatocellular carcinomas. *Nature*, 350(6317), 427–428. <https://doi.org/10.1038/350427A0>
- Huang, C., Chen, Y., Dai, H., Zhang, H., Xie, M., Zhang, H., Chen, F., Kang, X., Bai, X., & Chen, Z. (2019). UBAP2L arginine methylation by PRMT1 modulates stress granule assembly. *Cell Death & Differentiation* 2019 27:1, 27(1), 227–241. <https://doi.org/10.1038/s41418-019-0350-5>
- Huang, J., Dorsey, J., Chuikov, S., Zhang, X., Jenuwein, T., Reinberg, D., & Berger, S. L. (2010). G9a and Glp methylate lysine 373 in the tumor suppressor p53. *The Journal of Biological Chemistry*, 285(13), 9636–9641. <https://doi.org/10.1074/JBC.M109.062588>
- Huang, J., Perez-Burgos, L., Placek, B. J., Sengupta, R., Richter, M., Dorsey, J. A., Kubicek, S., Opravil, S., Jenuwein, T., & Berger, S. L. (2006). Repression of p53 activity by Smyd2-mediated methylation. *Nature*, 444(7119), 629–632. <https://doi.org/10.1038/NATURE05287>
- Huang, J., Sengupta, R., Espejo, A. B., Lee, M. G., Dorsey, J. A., Richter, M., Opravil, S., Shiekhata, R., Bedford, M. T., Jenuwein, T., & Berger, S. L. (2007). p53 is regulated by the lysine demethylase LSD1. *Nature* 2007 449:7158, 449(7158), 105–108. <https://doi.org/10.1038/nature06092>
- Hümmer, S., & Mayer, T. U. (2009). Cdk1 negatively regulates midzone localization of the mitotic kinesin Mklp2 and the chromosomal passenger complex. *Current Biology : CB*, 19(7), 607–612. <https://doi.org/10.1016/J.CUB.2009.02.046>
- Hwang, Y. J., Han, D., Kim, K. Y., Min, S. J., Kowall, N. W., Yang, L., Lee, J., Kim, Y., & Ryu, H. (2014). ESET methylates UBF at K232/254 and regulates nucleolar heterochromatin plasticity and rDNA transcription. *Nucleic Acids Research*, 42(3),

1628. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKT1041>

- Hwang, Y. J., Hyeon, S. J., Kim, Y., Lim, S., Lee, M. Y., Kim, J., Londhe, A. M., Gotina, L., Kim, Y., Pae, A. N., Cho, Y. S., Seong, J., Seo, H., Kim, Y. K., Choo, H., Ryu, H., & Min, S. J. (2021). Modulation of SETDB1 activity by APQ ameliorates heterochromatin condensation, motor function, and neuropathology in a Huntington's disease mouse model. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 36(1), 856. <https://doi.org/10.1080/14756366.2021.1900160>
- Ikeda, F., & Dikic, I. (2008). Atypical ubiquitin chains: new molecular signals. *EMBO Reports*, 9(6), 536–542. <https://doi.org/10.1038/EMBOR.2008.93>
- Israels, E. D., & Israels, L. G. (2000). The Cell Cycle. *The Oncologist*, 5(6), 510–513. <https://doi.org/10.1634/THEONCOLOGIST.5-6-510>
- Jakobsson, M. E. (2021). Enzymology and significance of protein histidine methylation. *Journal of Biological Chemistry*, 297(4). <https://doi.org/10.1016/J.JBC.2021.101130>
- Jeffery, L., & Nakielnny, S. (2004). Components of the DNA methylation system of chromatin control are RNA-binding proteins. *The Journal of Biological Chemistry*, 279(47), 49479–49487. <https://doi.org/10.1074/JBC.M409070200>
- Jelluma, N., Brenkman, A. B., van den Broek, N. J. F., Cruijssen, C. W. A., van Osch, M. H. J., Lens, S. M. A., Medema, R. H., & Kops, G. J. P. L. (2008). Mps1 phosphorylates Borealin to control Aurora B activity and chromosome alignment. *Cell*, 132(2), 233–246. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.11.046>
- Jensen, O. N. (2004). Modification-specific proteomics: Characterization of post-translational modifications by mass spectrometry. *Current Opinion in Chemical Biology*, 8(1), 33–41. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2003.12.009>
- Jenuwein, T., & Allis, C. D. (2001). Translating the histone code. *Science*, 293(5532), 1074–1080. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1063127/ASSET/FCD15CEA-ECDC-41AF-AE32-FEDCEA8620CC/ASSETS/GRAPHIC/SE3119652003.JPEG>
- Jessberger, R. (2002). The many functions of smc proteins in chromosome dynamics. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2002 3:10, 3(10), 767–778. <https://doi.org/10.1038/nrm930>
- Jeyaprakash, A. A., Basquin, C., Jayachandran, U., & Conti, E. (2011a). Structural basis for the recognition of phosphorylated histone h3 by the survivin subunit of the chromosomal passenger complex. *Structure (London, England: 1993)*, 19(11), 1625–1634. <https://doi.org/10.1016/J.STR.2011.09.002>
- Jeyaprakash, A. A., Basquin, C., Jayachandran, U., & Conti, E. (2011b). Structural basis for the recognition of phosphorylated histone H3 by the survivin subunit of the chromosomal passenger complex. *Structure*, 19(11), 1625–1634. <https://doi.org/10.1016/j.str.2011.09.002>

- Jeyaprakash, A. A., Klein, U. R., Lindner, D., Ebert, J., Nigg, E. A., & Conti, E. (2007). Structure of a Survivin–Borealin–INCENP core complex reveals how chromosomal passengers travel together. *Cell*, *131*(2), 271–285. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.07.045>
- Jiang, Y., Loh, Y. E., Rajarajan, P., Hirayama, T., Liao, W., Kassim, B. S., Javidfar, B., Hartley, B. J., Kleofas, L., Park, R. B., Labonte, B., Ho, S., Chandrasekaran, S., Do, C., Ramirez, B. R., Peter, C. J., Julia, T. C. W., Safaie, B. M., Morishita, H., ... Akbarian, S. (2017). The methyltransferase SETDB1 regulates a large neuron-specific topological chromatin domain. *Nature Publishing Group*, *49*(8), 1239–1250. <https://doi.org/10.1038/ng.3906>
- Johnson, E. S. (2004). Protein modification by SUMO. *Annual Review of Biochemistry*, *73*, 355–382. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV.BIOCHEM.73.011303.074118>
- Kang, J., Chaudhary, J., Dong, H., Kim, S., Brautigam, C. A., & Yua, H. (2011). Mitotic centromeric targeting of HP1 and its binding to Sgo1 are dispensable for sister-chromatid cohesion in human cells. *Mol. Biol. Cell*, *22*(8), 1181–1190. <https://doi.org/10.1091/mbc.e11-01-0009>
- Katsuno, Y., Suzuki, A., Sugimura, K., Okumura, K., Zineldeen, D. H., Shimada, M., Niida, H., Mizuno, T., Hanaoka, F., & Nakanishi, M. (2009). Cyclin A-Cdk1 regulates the origin firing program in mammalian cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *106*(9), 3184–3189. <https://doi.org/10.1073/PNAS.0809350106>
- Kearns, S., Mason, F. M., Rathmell, W. K., Park, I. Y., Walker, C., Verhey, K. J., & Cianfrocco, M. A. (2021). Molecular determinants for α -tubulin methylation by SETD2. *The Journal of Biological Chemistry*, *297*(1). <https://doi.org/10.1016/J.JBC.2021.100898>
- Kelly, A. E., Ghenoiu, C., Xue, J. Z., Zierhut, C., Kimura, H., & Funabiki, H. (2010). Survivin reads phosphorylated histone H3 threonine 3 to activate the mitotic kinase Aurora B. *Science (New York, N.Y.)*, *330*(6001), 235. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1189505>
- Kelly, A. E., Sampath, S. C., Maniar, T. A., Woo, E. M., Chait, B. T., & Funabiki, H. (2007). Chromosomal enrichment and activation of the Aurora B pathway are coupled to spatially regulate spindle assembly. *Dev. Cell*, *12*(1), 31–43. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2006.11.001>
- Keppler, B. R., & Archer, T. K. (2008). Chromatin-modifying enzymes as therapeutic targets – Part 1. <http://Dx.Doi.Org/10.1517/14728222.12.10.1301>, *12*(10), 1301–1312. <https://doi.org/10.1517/14728222.12.10.1301>
- Khleif, S. N., Degregori, J., Yee, C. L., Otterson, G. A., Kaye, F. J., Nevins, J. R., & Howley, P. M. (1996). Inhibition of cyclin D-CDK4/CDK6 activity is associated with an E2F-mediated induction of cyclin kinase inhibitor activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *93*(9), 4350–4354. <https://doi.org/10.1073/PNAS.93.9.4350>

- Kim, J., Hake, S. B., & Roeder, R. G. (2005). The human homolog of yeast BRE1 functions as a transcriptional coactivator through direct activator interactions. *Molecular Cell*, *20*(5), 759–770. <https://doi.org/10.1016/J.MOLCEL.2005.11.012>
- Kim, K. C., Geng, L., & Huang, S. (2003). Inactivation of a Histone Methyltransferase by Mutations in Human Cancers. *Cancer Research*, *63*(22), 7619–7623. <http://aacrjournals.org/cancerres/article-pdf/63/22/7619/2509856/zch02203007619.pdf>
- Kim, S., & Paik, W. K. (1965). Studies on the Origin of ϵ -N-Methyl-L-lysine in Protein. *Journal of Biological Chemistry*, *240*(12), 4629–4634. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)97001-8](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)97001-8)
- King, R. W., Jackson, P. K., & Kirschner, M. W. (1994). Mitosis in transition. *Cell*, *79*(4), 563–571. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(94\)90542-8](https://doi.org/10.1016/0092-8674(94)90542-8)
- Knowlton, A. L., Lan, W., & Stukenberg, P. T. (2006). Aurora B Is Enriched at Merotelic Attachment Sites, Where It Regulates MCAK. *Current Biology*, *16*(17), 1705–1710. <https://doi.org/10.1016/J.CUB.2006.07.057>
- Kontaki, H., & Talianidis, I. (2010). Lysine Methylation Regulates E2F1-Induced Cell Death. *Molecular Cell*, *39*(1), 152–160. <https://doi.org/10.1016/J.MOLCEL.2010.06.006>
- Koprinarova, M., Schnekenburger, M., & Diederich, M. (2015). Role of Histone Acetylation in Cell Cycle Regulation. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, *16*(7), 732–744. <https://doi.org/10.2174/1568026615666150825140822>
- Kozar, K., & Sicinski, P. (2005). Cell Cycle Progression without Cyclin D-CDK4 and Cyclin D-CDK6 Complexes. <https://doi.org/10.4161/Cc.4.3.1551>, *4*(3), 388–391. <https://doi.org/10.4161/CC.4.3.1551>
- Kuo, M. H., Zhou, J., Jambeck, P., Churchill, M. E. A., & Allis, C. D. (1998). Histone acetyltransferase activity of yeast Gcn5p is required for the activation of target genes in vivo. *Genes & Development*, *12*(5), 627–639. <https://doi.org/10.1101/GAD.12.5.627>
- Kurasawa, Y., Earnshaw, W. C., Mochizuki, Y., Dohmae, N., & Todokoro, K. (2004). Essential roles of KIF4 and its binding partner PRC1 in organized central spindle midzone formation. *The EMBO Journal*, *23*(16), 3237–3248. <https://doi.org/10.1038/SJ.EMBOJ.7600347>
- Kurash, J. K., Lei, H., Shen, Q., Marston, W. L., Granda, B. W., Fan, H., Wall, D., Li, E., & Gaudet, F. (2008). Methylation of p53 by Set7/9 Mediates p53 Acetylation and Activity In Vivo. *Molecular Cell*, *29*(3), 392–400. <https://doi.org/10.1016/J.MOLCEL.2007.12.025>
- Lara-Gonzalez, P., Scott, M. I. F., Diez, M., Sen, O., & Taylor, S. S. (2011). BubR1 blocks substrate recruitment to the APC/C in a KEN-box-dependent manner. *Journal of Cell Science*, *124*(24), 4332–4345. <https://doi.org/10.1242/JCS.094763>

- Lazaro-Camp, V. J., Salari, K., Meng, X., & Yang, S. (2021). Review Article SETDB1 in cancer: overexpression and its therapeutic implications. *Am J Cancer Res*, *11*(5), 1803–1827. www.ajcr.us/
- Lee, J., Hwang, Y. J., Boo, J. H., Han, D., Kwon, O. K., Todorova, K., Kowall, N. W., Kim, Y., & Ryu, H. (2011). Dysregulation of upstream binding factor-1 acetylation at K352 is linked to impaired ribosomal DNA transcription in Huntington's disease. *Cell Death and Differentiation*, *18*(11), 1726–1735. <https://doi.org/10.1038/CDD.2011.38>
- Lee, Junghee, Hwang, Y. J., Ryu, H., Kowall, N. W., & Ryu, H. (2014). Nucleolar dysfunction in Huntington's disease. *Biochimica et Biophysica Acta*, *1842*(6), 785–790. <https://doi.org/10.1016/J.BBADIS.2013.09.017>
- Lehnertz, B., Ueda, Y., Derijck, A. A. H. A., Braunschweig, U., Perez-Burgos, L., Kubicek, S., Chen, T., Li, E., Jenuwein, T., & Peters, A. H. F. M. (2003). Suv39h-mediated histone H3 lysine 9 methylation directs DNA methylation to major satellite repeats at pericentric heterochromatin. *Current Biology: CB*, *13*(14), 1192–1200. [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(03\)00432-9](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(03)00432-9)
- Lens, S. M. A., Rodriguez, J. A., Vader, G., Span, S. W., Giaccone, G., & Medema, R. H. (2006). Uncoupling the central spindle-associated function of the chromosomal passenger complex from its role at centromeres. *Mol. Biol. Cell*, *17*(4), 1897–1909. <https://doi.org/10.1091/mbc.e05-08-0727>
- Lens, S. M. A., Voest, E. E., & Medema, R. H. (2010). Shared and separate functions of polo-like kinases and aurora kinases in cancer. *Nature Rev. Cancer*, *10*(12), 825–841. <https://doi.org/10.1038/nrc2964>
- Li, L. X., Zhou, J. X., Wang, X., Zhang, H., Harris, P. C., Calvet, J. P., & Li, X. (2020). Cross-talk between CDK4/6 and SMYD2 regulates gene transcription, tubulin methylation, and ciliogenesis. *Science Advances*, *6*(44). <https://doi.org/10.1126/SCIADV.ABB3154>
- Ling, B. M. T., Bharathy, N., Chung, T. K., Kok, W. K., Li, S. De, Tan, Y. H., Rao, V. K., Gopinadhan, S., Sartorelli, V., Walsh, M. J., & Taneja, R. (2012). Lysine methyltransferase G9a methylates the transcription factor MyoD and regulates skeletal muscle differentiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *109*(3), 841–846. <https://doi.org/10.1073/PNAS.1111628109>
- Lipp, J. J., Hirota, T., Poser, I., & Peter, J. M. (2007). Aurora B controls the association of condensin I but not condensin II with mitotic chromosomes. *Journal of Cell Science*, *120*(Pt 7), 1245–1255. <https://doi.org/10.1242/JCS.03425>
- Listovsky, T., Zor, A., Laronne, A., & Brandeis, M. (2000). Cdk1 Is Essential for Mammalian Cyclosome/APC Regulation. *Experimental Cell Research*, *255*(2), 184–191. <https://doi.org/10.1006/EXCR.1999.4788>
- Liu, N., Balliano, A., & Hayes, J. J. (2011). *Mechanism(s) of SWI/SNF-Induced*

Nucleosome Mobilization Strategies to regulate chromatin accessibility.
<https://doi.org/10.1002/cbic.201000455>

- Loyola, A., Tagami, H., Bonaldi, T., Roche, D., Quivy, J. P., Imhof, A., Nakatani, Y., Dent, S. Y. R., & Almouzni, G. (2009). The HP1alpha-CAF1-SetDB1-containing complex provides H3K9me1 for Suv39-mediated K9me3 in pericentric heterochromatin. *EMBO Reports*, 10(7), 769–775. <https://doi.org/10.1038/embor.2009.90>
- Lynch, J. M., Maillet, M., Vanhoutte, D., Schloemer, A., Sargent, M. A., Blair, N. S., Lynch, K. A., Okada, T., Aronow, B. J., Osinska, H., Prywes, R., Lorenz, J. N., Mori, K., Lawler, J., Robbins, J., & Molkentin, J. D. (2012). A thrombospondin-dependent pathway for a protective ER stress response. *Cell*, 149(6), 1257–1268. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2012.03.050>
- Maerki, S., Olma, M. H., Staubli, T., Steigemann, P., Gerlich, D. W., Quadroni, M., Sumara, I., & Peter, M. (2009). The Cul3-KLHL21 E3 ubiquitin ligase targets Aurora B to midzone microtubules in anaphase and is required for cytokinesis. *Journal of Cell Biology*, 187(6), 791–800. <https://doi.org/10.1083/JCB.200906117/VIDEO-5>
- Maher, C. A., & Wilson, R. K. (2012). Chromothripsis and Human Disease: Piecing Together the Shattering Process. *Cell*, 148(0), 29. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2012.01.006>
- Malumbres, M. (2014). Cyclin-dependent kinases. *Genome Biology*, 15(6), 1–10. <https://doi.org/10.1186/GB4184/FIGURES/4>
- Martin, C., & Zhang, Y. (2005). The diverse functions of histone lysine methylation. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2005 6:11, 6(11), 838–849. <https://doi.org/10.1038/nrm1761>
- Matsui, S., Seon, B. K., & Sandberg, A. A. (1979). Disappearance of a structural chromatin protein A24 in mitosis: implications for molecular basis of chromatin condensation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 76(12), 6386–6390. <https://doi.org/10.1073/PNAS.76.12.6386>
- Matsui, T., Leung, D., Miyashita, H., Maksakova, I. A., Miyachi, H., Kimura, H., Tachibana, M., Lorincz, M. C., & Shinkai, Y. (2010). Proviral silencing in embryonic stem cells requires the histone methyltransferase ESET. *Nature*, 464(7290), 927–931. <https://doi.org/10.1038/nature08858>
- Matunis, M. J., Wu, J., & Blobel, G. (1998). SUMO-1 Modification and Its Role in Targeting the Ran GTPase-activating Protein, RanGAP1, to the Nuclear Pore Complex. *The Journal of Cell Biology*, 140(3), 499. <https://doi.org/10.1083/JCB.140.3.499>
- Mcvey, S. L., Cosby, J. K., & Nannas, N. J. (2021). *Molecular Sciences Aurora B Tension Sensing Mechanisms in the Kinetochores Ensure Accurate Chromosome Segregation.* <https://doi.org/10.3390/ijms22168818>

- Merkenschlager, M., & Nora, E. P. (2016). CTCF and Cohesin in Genome Folding and Transcriptional Gene Regulation. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*, 17, 17–43. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV-GENOM-083115-022339>
- Messmer, S., Franke, A., & Paro, R. (1992). Analysis of the functional role of the Polycomb chromo domain in *Drosophila melanogaster*. *Genes & Development*, 6(7), 1241–1254. <https://doi.org/10.1101/GAD.6.7.1241>
- Mirchenko, L., & Uhlmann, F. (2010). Sli15(INCENP) dephosphorylation prevents mitotic checkpoint reengagement due to loss of tension at anaphase onset. *Curr. Biol.*, 20(15), 1396–1401. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2010.06.023>
- Moore, K. E., Carlson, S. M., Camp, N. D., Cheung, P., James, R. G., Chua, K. F., Wolf-Yadlin, A., & Gozani, O. (2013). A general molecular affinity strategy for global detection and proteomic analysis of lysine methylation. *Molecular Cell*, 50(3), 444–456. <https://doi.org/10.1016/J.MOLCEL.2013.03.005>
- Mosammamarast, N., & Shi, Y. (2010). Reversal of histone methylation: Biochemical and molecular mechanisms of histone demethylases. *Annual Review of Biochemistry*, 79, 155–179. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV.BIOCHEM.78.070907.103946>
- Mosavi, L. K., Cammett, T. J., Desrosiers, D. C., & Peng, Z. (2004). The ankyrin repeat as molecular architecture for protein recognition. *Protein Science*, 13(6), 1435–1448. <https://doi.org/10.1110/PS.03554604>
- Mozzetta, C., Boyarchuk, E., Pontis, J., & Ait-Si-Ali, S. (2015). Sound of silence: the properties and functions of repressive Lys methyltransferases. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 16(8), 499–513. <https://doi.org/10.1038/nrm4029>
- Murray, K. (1964). THE OCCURRENCE OF EPSILON-N-METHYL LYSINE IN HISTONES. *Biochemistry*, 3(1), 10–15. <https://doi.org/10.1021/BI00889A003>
- Nakagawa, T., Kajitani, T., Togo, S., Masuko, N., Ohdan, H., Hishikawa, Y., Koji, T., Matsuyama, T., Ikura, T., Muramatsu, M., & Ito, T. (2008). Deubiquitylation of histone H2A activates transcriptional initiation via trans-histone cross-talk with H3K4 di- and trimethylation. *Genes & Development*, 22(1), 37–49. <https://doi.org/10.1101/GAD.1609708>
- Nakajima, Y., Cormier, A., Tyers, R. G., Pigula, A., Peng, Y., Drubin, D. G., & Barnes, G. (2011). Ipl1/Aurora-dependent phosphorylation of Sli15/INCENP regulates CPC–spindle interaction to ensure proper microtubule dynamics. *J. Cell Biol.*, 194(1), 137–153. <https://doi.org/10.1083/jcb.201009137>
- Narasimha, A. M., Kaulich, M., Shapiro, G. S., Choi, Y. J., Sicinski, P., & Dowdy, S. F. (2014). Cyclin D activates the Rb tumor suppressor by mono-phosphorylation. *ELife*, 2014(3), 2872. <https://doi.org/10.7554/ELIFE.02872.001>
- Neurohr, G., Naegeli, A., Titos, I., Theler, D., Greber, B., Díez, J., Gabaldón, T.,

- Mendoza, M., & Barral, Y. (2011). A midzone-based ruler adjusts chromosome compaction to anaphase spindle length. *Science*, 332(6028), 465–468. https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1201578/SUPPL_FILE/NEUROHR_SOM.PDF
- Nicklas, R. B., & Koch, C. A. (1969). Chromosome micromanipulation. 3. Spindle fiber tension and the reorientation of mal-oriented chromosomes. *The Journal of Cell Biology*, 43(1), 40–50. <https://doi.org/10.1083/JCB.43.1.40>
- Nielsen, P. R., Nietlispach, D., Mott, H. R., Callaghan, J., Bannister, A., Kouzarides, T., Murzin, A. G., Murzina, N. V., & Laue, E. D. (2002). Structure of the HP1 chromodomain bound to histone H3 methylated at lysine 9. *Nature* 2002 416:6876, 416(6876), 103–107. <https://doi.org/10.1038/nature722>
- Nigg, E. A. (2001). Mitotic kinases as regulators of cell division and its checkpoints. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2001 2:1, 2(1), 21–32. <https://doi.org/10.1038/35048096>
- Nozawa, R. S., Nagao, K., Masuda, H. T., Iwasaki, O., Hirota, T., Nozaki, N., Kimura, H., & Obuse, C. (2010). Human POGZ modulates dissociation of HP1 α from mitotic chromosome arms through Aurora B activation. *Nature Cell Biol.*, 12(7), 719–727. <https://doi.org/10.1038/ncb2075>
- Ntranos, A., & Casaccia, P. (2016). Bromodomains: translating the words of lysine acetylation into myelin injury and repair. *Neuroscience Letters*, 625, 4. <https://doi.org/10.1016/J.NEULET.2015.10.015>
- Ogawa, H., Ishiguro, K. I., Gaubatz, S., Livingston, D. M., & Nakatani, Y. (2002). A complex with chromatin modifiers that occupies E2f- and Myc-responsive genes in G0 cells. *Science*, 296(5570), 1132–1136. https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1069861/SUPPL_FILE/OGAWASUPPL.DOC
- Ogawa, S., Fukuda, A., Matsumoto, Y., Hanyu, Y., Sono, M., Fukunaga, Y., Masuda, T., Araki, O., Nagao, M., Yoshikawa, T., Goto, N., Hiramatsu, Y., Tsuda, M., Maruno, T., Nakanishi, Y., Hussein, M. S., Tsuruyama, T., Takaori, K., Uemoto, S., & Seno, H. (2020). SETDB1 Inhibits p53-Mediated Apoptosis and Is Required for Formation of Pancreatic Ductal Adenocarcinomas in Mice. *Gastroenterology*, 159(2), 682-696.e13. <https://doi.org/10.1053/J.GASTRO.2020.04.047>
- Olsen, C. A. (2012). Expansion of the Lysine Acylation Landscape. *Angewandte Chemie International Edition*, 51(16), 3755–3756. <https://doi.org/10.1002/ANIE.201200316>
- Olsen, J. B., Cao, X.-J., Han, B., Chen, L. H., Horvath, A., Richardson, T. I., Campbell, R. M., Garcia, B. A., & Nguyen, H. (2016). *Quantitative Profiling of the Activity of Protein Lysine Methyltransferase SMYD2 Using SILAC-Based Proteomics** □ S. <https://doi.org/10.1074/mcp.M115.053280>
- Ono, T., Losada, A., Hirano, M., Myers, M. P., Neuwald, A. F., & Hirano, T. (2003). Differential contributions of condensin I and condensin II to mitotic chromosome architecture in vertebrate cells. *Cell*, 115(1), 109–121.

[https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(03\)00724-4](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(03)00724-4)

- Paik, W. K., & Kim, S. (1967). E-N-dimethyllysine in histones. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 27(4), 479–483. [https://doi.org/10.1016/S0006-291X\(67\)80010-X](https://doi.org/10.1016/S0006-291X(67)80010-X)
- Paik, W. K., & Kim, S. (1971). Protein methylation. *Science*, 174(4005), 114–119. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.174.4005.114/ASSET/39434D7E-1B84-4F77-A92E-837D97DD07B8/ASSETS/SCIENCE.174.4005.114.FP.PNG>
- Paik, W. K., & Kim, S. (1973). Enzymatic demethylation of calf thymus histones. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 51(3), 781–788. [https://doi.org/10.1016/0006-291X\(73\)91383-1](https://doi.org/10.1016/0006-291X(73)91383-1)
- Pasquarella, A., Ebert, A., de Almeida, G. P., Hinterberger, M., Kazerani, M., Nuber, A., Ellwart, J., Klein, L., Busslinger, M., & Schotta, G. (2016). Retrotransposon derepression leads to activation of the unfolded protein response and apoptosis in pro-B cells. *Development (Cambridge)*, 143(10), 1788–1799. <https://doi.org/10.1242/DEV.130203/-/DC1>
- Paweletz, N. (2001). Walther Flemming: pioneer of mitosis research. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2001 2:1, 2(1), 72–75. <https://doi.org/10.1038/35048077>
- Pelletier, G., Stefanovsky, V. Y., Faubladiere, M., Hirschler-Laszkiwicz, I., Savard, J., Rothblum, L. I., Côté, J., & Moss, T. (2000). Competitive recruitment of CBP and Rb-HDAC regulates UBF acetylation and ribosomal transcription. *Molecular Cell*, 6(5), 1059–1066. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(00\)00104-0](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(00)00104-0)
- Pereira, G., & Schiebel, E. (2003). Separase regulates INCENP–Aurora B anaphase spindle function through Cdc14. *Science*, 302(5653), 2120–2124. <https://doi.org/10.1126/science.1091936>
- Peters, A. H. F. M., O'Carroll, D., Scherthan, H., Mechtler, K., Sauer, S., Schöfer, C., Weipoltshammer, K., Pagani, M., Lachner, M., Kohlmaier, A., Opravil, S., Doyle, M., Sibilia, M., & Jenuwein, T. (2001). Loss of the Suv39h histone methyltransferases impairs mammalian heterochromatin and genome stability. *Cell*, 107(3), 323–337. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(01\)00542-6](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(01)00542-6)
- Peters, J. M. (1998). SCF and APC: the Yin and Yang of cell cycle regulated proteolysis. *Current Opinion in Cell Biology*, 10(6), 759–768. [https://doi.org/10.1016/S0955-0674\(98\)80119-1](https://doi.org/10.1016/S0955-0674(98)80119-1)
- Petersen, B. O., Lukas, J., Sørensen, C. S., Bartek, J., & Helin, K. (1999). Phosphorylation of mammalian CDC6 by Cyclin A/CDK2 regulates its subcellular localization. *The EMBO Journal*, 18(2), 396–410. <https://doi.org/10.1093/EMBOJ/18.2.396>
- Petti, E., Jordi, F., Buemi, V., Dinami, R., Benetti, R., Blasco, M. A., & Schoeftner, S. (2015). Altered telomere homeostasis and resistance to skin carcinogenesis in suv39h1 transgenic mice. *Cell Cycle*, 14(9), 1438–1446.

<https://doi.org/10.1080/15384101.2015.1021517>

- Picard, A., Labbe, J. C., & Doree, M. (1988). The cell cycle can occur in starfish oocytes and embryos without the production of transferable MPF (maturation-promoting factor). *Developmental Biology*, 128(1), 129–135. [https://doi.org/10.1016/0012-1606\(88\)90274-6](https://doi.org/10.1016/0012-1606(88)90274-6)
- Pickart, C. M. (1998). Polyubiquitin Chains. *Ubiquitin and the Biology of the Cell*, 19–63. https://doi.org/10.1007/978-1-4899-1922-9_2
- Pickart, C. M. (2004). Back to the future with ubiquitin. *Cell*, 116(2), 181–190. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(03\)01074-2](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(03)01074-2)
- Pinheiro, I., Margueron, R., Shukeir, N., Eisold, M., Fritsch, C., Richter, F. M., Mittler, G., Genoud, C., Goyama, S., Kurokawa, M., Son, J., Reinberg, D., Lachner, M., & Jenuwein, T. (2012). Prdm3 and Prdm16 are H3K9me1 Methyltransferases Required for Mammalian Heterochromatin Integrity. *Cell*, 150(5), 948–960. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2012.06.048>
- Ponting, C. P. (1997). Tudor domains in proteins that interact with RNA. *Trends in Biochemical Sciences*, 22(2), 51–52. [https://doi.org/10.1016/S0968-0004\(96\)30049-2](https://doi.org/10.1016/S0968-0004(96)30049-2)
- Potapova, T., & Gorbsky, G. J. (2017). The Consequences of Chromosome Segregation Errors in Mitosis and Meiosis. *Biology*, 6(1). <https://doi.org/10.3390/BIOLOGY6010012>
- Qi, M., Yu, W., Liu, S., Jia, H., Tang, L., Shen, M., Yan, X., Saiyin, H., Lang, Q., Wan, B., Zhao, S., & Yu, L. (2005). Septin1, a new interaction partner for human serine/threonine kinase aurora-B. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 336(3), 994–1000. <https://doi.org/10.1016/J.BBRC.2005.06.212>
- Rai, K., Nadauld, L. D., Chidester, S., Manos, E. J., James, S. R., Karpf, A. R., Cairns, B. R., & Jones, D. A. (2006). Zebra fish Dnmt1 and Suv39h1 regulate organ-specific terminal differentiation during development. *Molecular and Cellular Biology*, 26(19), 7077–7085. <https://doi.org/10.1128/MCB.00312-06>
- Rajan, P. K., Udoh, U. A., Sanabria, J. D., Banerjee, M., Smith, G., Schade, M. S., Sanabria, J., Sodhi, K., Pierre, S., Xie, Z., Shapiro, J. I., & Sanabria, J. (2020). The Role of Histone Acetylation-/Methylation-Mediated Apoptotic Gene Regulation in Hepatocellular Carcinoma. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(23), 1–21. <https://doi.org/10.3390/IJMS21238894>
- Rao, S. S. P., Huntley, M. H., Durand, N. C., Stamenova, E. K., Bochkov, I. D., Robinson, J. T., Sanborn, A. L., Machol, I., Omer, A. D., Lander, E. S., & Aiden, E. L. (2014). A 3D map of the human genome at kilobase resolution reveals principles of chromatin looping. *Cell*, 159(7), 1665–1680. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2014.11.021/ATTACHMENT/CB0E9D91-BC65-40C2-ACB4-623802E0869F/MMC3.XLSX>

- Rao, V. K., Pal, A., & Taneja, R. (2017). *A drive in SUVs: From development to disease*. <https://doi.org/10.1080/15592294.2017.1281502>
- Rapone, R., Del Maestro, L., Bouyioukos, C., Albin, S., Cruz-Tapias, P., Joliot, V., Cosson, B., & Ait-Si-Ali, S. (2022). *Essential Cytoplasmic Role of the Histone Lysine Methyltransferase Setdb1 in Post-Transcriptional Regulation in Embryonic Stem Cells*. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-145869/v1>
- Rea, S., Eisenhaber, F., O'Carroll, D., Strahl, B. D., Sun, Z. W., Schmid, M., Opravil, S., Mechtler, K., Ponting, C. P., Allis, C. D., & Jenuwein, T. (2000). Regulation of chromatin structure by site-specific histone H3 methyltransferases. *Nature* 2000 406:6796, 406(6796), 593–599. <https://doi.org/10.1038/35020506>
- Regina, C., Compagnone, M., Peschiaroli, A., Lena, A. M., Annicchiarico-Petruzzelli, M., Piro, M. C., Melino, G., & Candi, E. (2016). Setdb1, a novel interactor of ΔNp63, is involved in breast tumorigenesis. *Oncotarget*, 7(20), 28836–28848. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.7089>
- Reimann, M., Lee, S., Loddenkemper, C., Dörr, J. R., Tabor, V., Aichele, P., Stein, H., Dörken, B., Jenuwein, T., & Schmitt, C. A. (2010). Tumor stroma-derived TGF-β limits myc-driven lymphomagenesis via Suv39h1-dependent senescence. *Cancer Cell*, 17(3), 262–272. <https://doi.org/10.1016/J.CCR.2009.12.043>
- Rice, R. H., Means, G. E., & Brown, W. D. (1977). Stabilization of bovine trypsin by reductive methylation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure*, 492(2), 316–321. [https://doi.org/10.1016/0005-2795\(77\)90082-4](https://doi.org/10.1016/0005-2795(77)90082-4)
- Rodriguez-Paredes, M., Martinez de Paz, A., Simó-Riudalbas, L., Sayols, S., Moutinho, C., Moran, S., Villanueva, A., Vázquez-Cedeira, M., Lazo, P. A., Carneiro, F., Moura, C. S., Vieira, J., Teixeira, M. R., & Esteller, M. (2014). Gene amplification of the histone methyltransferase SETDB1 contributes to human lung tumorigenesis. *Oncogene*, 33(21), 2807–2813. <https://doi.org/10.1038/onc.2013.239>
- Roopra, A., Qazi, R., Schoenike, B., Daley, T. J., & Morrison, J. F. (2004). Localized domains of G9a-mediated histone methylation are required for silencing of neuronal genes. *Molecular Cell*, 14(6), 727–738. <https://doi.org/10.1016/J.MOLCEL.2004.05.026/ATTACHMENT/C9E8FA63-E5C6-4E10-9AB1-EB73604FDF63/MMC1.PDF>
- Rosasco-Nitcher, S. E., Lan, W., Khorasanizadeh, S., & Stukenberg, P. T. (2008). Centromeric Aurora-B activation requires TD-60, microtubules, and substrate priming phosphorylation. *Science*, 319(5862), 469–472. <https://doi.org/10.1126/science.1148980>
- Ruchaud, S., Carmena, M., & Earnshaw, W. C. (2007). Chromosomal passengers: conducting cell division. *Nature Rev. Mol. Cell. Biol.*, 8(10), 798–812. <https://doi.org/10.1038/nrm2257>
- Sampath, S. C., Ohi, R., Leismann, O., Salic, A., Pozniakovski, A., & Funabiki, H.

- (2004). The chromosomal passenger complex is required for chromatin-induced microtubule stabilization and spindle assembly. *Cell*, 118(2), 187–202. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2004.06.026>
- Sawan, C., & Herceg, Z. (2010). Histone Modifications and Cancer. *Advances in Genetics*, 70(C), 57–85. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-380866-0.60003-4>
- Sawicka, A., & Seiser, C. (2012). Histone H3 phosphorylation – A versatile chromatin modification for different occasions. *Biochimie*, 94(11), 2193. <https://doi.org/10.1016/J.BIOCHI.2012.04.018>
- Schotta, G., Ebert, A., Krauss, V., Fischer, A., Hoffmann, J., Rea, S., Jenuwein, T., Dorn, R., & Reuter, G. (2002). Central role of Drosophila SU(VAR)3-9 in histone H3-K9 methylation and heterochromatic gene silencing. *The EMBO Journal*, 21(5), 1121–1131. <https://doi.org/10.1093/EMBOJ/21.5.1121>
- Schultz, D. C., Ayyanathan, K., Negorev, D., Maul, G. G., & Rauscher, F. J. (2002). SETDB1: A novel KAP-1-associated histone H3, lysine 9-specific methyltransferase that contributes to HP1-mediated silencing of euchromatic genes by KRAB zinc-finger proteins. *Genes and Development*, 16(8), 919–932. <https://doi.org/10.1101/gad.973302>
- Sessa, F., Mapelli, M., Ciferri, C., Tarricone, C., Areces, L. B., Schneider, T. R., Stukenberg, P. T., & Musacchio, A. (2005). Mechanism of Aurora B activation by INCENP and inhibition by hesperadin. *Mol. Cell*, 18(3), 379–391. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2005.03.031>
- Seto, E., & Yoshida, M. (2014). Erasers of Histone Acetylation: The Histone Deacetylase Enzymes. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 6(4). <https://doi.org/10.1101/CSHPERSPECT.A018713>
- Seum, C., Reo, E., Peng, H., Rauscher, F. J., Spierer, P., & Bontron, S. (2007). Drosophila SETDB1 Is Required for Chromosome 4 Silencing. *PLoS Genetics*, 3(5), 709–719. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PGEN.0030076>
- Shankar, S. R., Bahirvani, A. G., Rao, V. K., Bharathy, N., Ow, J. R., & Taneja, R. (2012). G9a, a multipotent regulator of gene expression. [Http://Dx.Doi.Org/10.4161/Epi.23331](http://Dx.Doi.Org/10.4161/Epi.23331), 8(1), 16–22. <https://doi.org/10.4161/EPI.23331>
- Sheaff, R. J., Groudine, M., Gordon, M., Roberts, J. M., & Clurman, B. E. (1997). Cyclin E-CDK2 is a regulator of p27Kip1. *Genes & Development*, 11(11), 1464–1478. <https://doi.org/10.1101/GAD.11.11.1464>
- Shi, S. P., Qiu, J. D., Sun, X. Y., Suo, S. B., Huang, S. Y., & Liang, R. P. (2012). PLMLA: Prediction of lysine methylation and lysine acetylation by combining multiple features. *Molecular BioSystems*, 8(5), 1520–1527. <https://doi.org/10.1039/C2MB05502C>
- Shi, X., Kachirskaja, I., Yamaguchi, H., West, L. E., Wen, H., Wang, E. W., Dutta, S.,

- Appella, E., & Gozani, O. (2007). Modulation of p53 function by SET8-mediated methylation at lysine 382. *Molecular Cell*, 27(4), 636. <https://doi.org/10.1016/J.MOLCEL.2007.07.012>
- Sims, R. J., Nishioka, K., & Reinberg, D. (2003). Histone lysine methylation: a signature for chromatin function. *Trends in Genetics*, 19(11), 629–639. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2003.09.007>
- Singh, P., Cho, J., Tsai, S. Y., Rivas, G. E., Larson, G. P., & Szabó, P. E. (2010). Coordinated allele-specific histone acetylation at the differentially methylated regions of imprinted genes. *Nucleic Acids Research*, 38(22), 7974–7990. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKQ680>
- Snowden, A. W., Gregory, P. D., Case, C. C., & Pabo, C. O. (2002). Gene-Specific Targeting of H3K9 Methylation Is Sufficient for Initiating Repression In Vivo. *Current Biology*, 12(24), 2159–2166. [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(02\)01391-X](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(02)01391-X)
- Song, Y. J., Choi, J. H., & Lee, H. (2015). Setdb1 is required for myogenic differentiation of C2C12 myoblast cells via maintenance of MyoD expression. *Molecules and Cells*, 38(4), 362–372. <https://doi.org/10.14348/MOLCELLS.2015.2291>
- Stabell, M., Eskeland, R., Bjørkmo, M., Larsson, J., Aalen, R. B., Imhof, A., & Lambertsson, A. (2006). The Drosophila G9a gene encodes a multi-catalytic histone methyltransferase required for normal development. *Nucleic Acids Research*, 34(16), 4609–4621. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKL640>
- Strepkos, D., Markouli, M., Klonou, A., Papavassiliou, A. G., & Piperi, C. (2021). Histone Methyltransferase SETDB1: A Common Denominator of Tumorigenesis with Therapeutic Potential. *Cancer Research*, 81(3), 525–534. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-20-2906/654631/AM/HISTONE-METHYLTRANSFERASE-SETDB1-A-COMMON>
- Sun, Y., Wei, M., Ren, S. C., Chen, R., Xu, W. D., Wang, F. B., Lu, J., Shen, J., Yu, Y. W., Hou, J. G., Xu, C. L., Huang, J. T., & Sun, Y. H. (2014). Histone methyltransferase SETDB1 is required for prostate cancer cell proliferation, migration and invasion. *Asian Journal of Andrology*, 16(2), 319. <https://doi.org/10.4103/1008-682X.122812>
- Szafer-Glusman, E., Fuller, M. T., & Giansanti, M. G. (2011). Role of Survivin in cytokinesis revealed by a separation-of-function allele. *Mol. Biol. Cell*, 22(20), 3779–3790. <https://doi.org/10.1091/mbc.e11-06-0569>
- Tachibana, M., Matsumura, Y., Fukuda, M., Kimura, H., & Shinkai, Y. (2008). G9a/GLP complexes independently mediate H3K9 and DNA methylation to silence transcription. *The EMBO Journal*, 27(20), 2681–2690. <https://doi.org/10.1038/EMBOJ.2008.192>
- Tachibana, M., Nozaki, M., Takeda, N., & Shinkai, Y. (2007). Functional dynamics of

- H3K9 methylation during meiotic prophase progression. *The EMBO Journal*, 26(14), 3346–3359. <https://doi.org/10.1038/SJ.EMBOJ.7601767>
- Tachibana, M., Ueda, J., Fukuda, M., Takeda, N., Ohta, T., Iwanari, H., Sakihama, T., Kodama, T., Hamakubo, T., & Shinkai, Y. (2005). Histone methyltransferases G9a and GLP form heteromeric complexes and are both crucial for methylation of euchromatin at H3-K9. *Genes & Development*, 19(7), 815–826. <https://doi.org/10.1101/GAD.1284005>
- Takada, I., Kouzmenko, A. P., & Kato, S. (2010). PPAR-gamma Signaling Crosstalk in Mesenchymal Stem Cells. *PPAR Research*, 2010. <https://doi.org/10.1155/2010/341671>
- Takai, H., Masuda, K., Sato, T., Sakaguchi, Y., Suzuki, T., Suzuki, T., Koyama-Nasu, R., Nasu-Nishimura, Y., Katou, Y., Ogawa, H., Morishita, Y., Kozuka-Hata, H., Oyama, M., Todo, T., Ino, Y., Mukasa, A., Saito, N., Toyoshima, C., Shirahige, K., & Akiyama, T. (2014). 5-Hydroxymethylcytosine Plays a Critical Role in Glioblastomagenesis by Recruiting the CHTOP-Methylosome Complex. *Cell Reports*, 9(1), 48–60. <https://doi.org/10.1016/J.CELREP.2014.08.071>
- Tan, M., Luo, H., Lee, S., Jin, F., Yang, J. S., Montellier, E., Buchou, T., Cheng, Z., Rousseaux, S., Rajagopal, N., Lu, Z., Ye, Z., Zhu, Q., Wysocka, J., Ye, Y., Khochbin, S., Ren, B., & Zhao, Y. (2011). Identification of 67 Histone Marks and Histone Lysine Crotonylation as a New Type of Histone Modification. *Cell*, 146(6), 1016–1028. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2011.08.008>
- Terret, M. E., Wassmann, K., Waizenegger, I., Maro, B., Peters, J. M., & Verlhac, M. H. (2003). The Meiosis I-to-Meiosis II Transition in Mouse Oocytes Requires Separase Activity. *Current Biology*, 13(20), 1797–1802. <https://doi.org/10.1016/J.CUB.2003.09.032>
- Thomä, N. H., Czyzewski, B. K., Alexeev, A. A., Mazin, A. V, Kowalczykowski, S. C., & Pavletich, N. P. (2005). Structure of the SWI2/SNF2 chromatin-remodeling domain of eukaryotic Rad54. *NATURE STRUCTURAL & MOLECULAR BIOLOGY*, 12. <https://doi.org/10.1038/nsmb919>
- Thornton, B. R., Ng, T. M., Matyskiela, M. E., Carroll, C. W., Morgan, D. O., & Toczyski, D. P. (2006). An architectural map of the anaphase-promoting complex. *Genes & Development*, 20(4), 449–460. <https://doi.org/10.1101/GAD.1396906>
- Thrower, J. S., Hoffman, L., Rechsteiner, M., & Pickart, C. M. (2000). Recognition of the polyubiquitin proteolytic signal. *The EMBO Journal*, 19(1), 94–102. <https://doi.org/10.1093/EMBOJ/19.1.94>
- Torrano, J., Al Emran, A., Hammerlindl, H., & Schaidler, H. (2019). Emerging roles of H3K9me3, SETDB1 and SETDB2 in therapy-induced cellular reprogramming. In *Clinical Epigenetics* (Vol. 11, Issue 1). <https://doi.org/10.1186/s13148-019-0644-y>
- Trivedi, P., Zaytsev, A. V., Godzi, M., Ataulakhanov, F. I., Grishchuk, E. L., &

- Stukenberg, P. T. (2019). The binding of Borealin to microtubules underlies a tension independent kinetochore-microtubule error correction pathway. *Nature Communications* 2019 10:1, 10(1), 1–19. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-08418-4>
- Tsukahara, T., Tanno, Y., & Watanabe, Y. (2010). Phosphorylation of the CPC by Cdk1 promotes chromosome bi-orientation. *Nature* 2010 467:7316, 467(7316), 719–723. <https://doi.org/10.1038/nature09390>
- Uren, A. G., Beilharz, T., O'Connell, M. J., Bugg, S. J., Van Driel, R., Vaux, D. L., & Lithgow, T. (1999). Role for yeast inhibitor of apoptosis (IAP)-like proteins in cell division. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 96(18), 10170–10175. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.18.10170>
- Vakoc, C. R., Mandat, S. A., Olenchok, B. A., & Blobel, G. A. (2005). Histone H3 lysine 9 methylation and HP1gamma are associated with transcription elongation through mammalian chromatin. *Molecular Cell*, 19(3), 381–391. <https://doi.org/10.1016/J.MOLCEL.2005.06.011>
- Vakoc, C. R., Sachdeva, M. M., Wang, H., & Blobel, G. A. (2006). Profile of Histone Lysine Methylation across Transcribed Mammalian Chromatin. *Molecular and Cellular Biology*, 26(24), 9185. <https://doi.org/10.1128/MCB.01529-06>
- van der Waal, M. S., Hengeveld, R. C. C., van der Horst, A., & Lens, S. M. A. (2012). Cell division control by the chromosomal passenger complex. *Exp. Cell Res.*, 318(12), 1407–1420. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2012.03.015>
- Van Duyne, R., Easley, R., Wu, W., Berro, R., Pedati, C., Klase, Z., Kehn-Hall, K., Flynn, E. K., Symer, D. E., & Kashanchi, F. (2008). Lysine methylation of HIV-1 Tat regulates transcriptional activity of the viral LTR. *Retrovirology*, 5, 40. <https://doi.org/10.1186/1742-4690-5-40>
- Van Hooser, A., Goodrich, D. W., David Allis, C., Brinkley, B. R., & Mancini, M. A. (1998). Histone H3 phosphorylation is required for the initiation, but not maintenance, of mammalian chromosome condensation. *Journal of Cell Science*, 111(23), 3497–3506. <https://doi.org/10.1242/JCS.111.23.3497>
- Vázquez-Novelle, M. D., & Petronczki, M. (2010). Relocation of the chromosomal passenger complex prevents mitotic checkpoint engagement at anaphase. *Curr. Biol.*, 20(15), 1402–1407. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2010.06.036>
- Völkel, P., & Angrand, P. O. (2007). The control of histone lysine methylation in epigenetic regulation. *Biochimie*, 89(1), 1–20. <https://doi.org/10.1016/J.BIOCHI.2006.07.009>
- Vong, Q. P., Cao, K., Li, H. Y., Iglesias, P. A., & Zheng, Y. (2005). Chromosome alignment and segregation regulated by ubiquitination of survivin. *Science*, 310(5753), 1499–1504. <https://doi.org/10.1126/science.1120160>
- Waddington, C. H. H. (2011). The Epigenotype. [Article]. *International Journal of*

Epidemiology, 41(1), 10–13. <https://doi.org/info:doi/>

- Wang, H., An, W., Cao, R., Xia, L., Erdjument-Bromage, H., Chatton, B., Tempst, P., Roeder, R. G., & Zhang, Y. (2003). mAM facilitates conversion by ESET of dimethyl to trimethyl lysine 9 of histone H3 to cause transcriptional repression. *Molecular Cell*, 12(2), 475–487. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2003.08.007>
- Wang, H., Wang, L., Erdjument-Bromage, H., Vidal, M., Tempst, P., Jones, R. S., & Zhang, Y. (2004). Role of histone H2A ubiquitination in Polycomb silencing. *Nature*, 431(7010), 873–878. <https://doi.org/10.1038/NATURE02985>
- Welburn, J. P. I., Vleugel, M., Liu, D., Yates, J. R., Lampson, M. A., Fukagawa, T., & Cheeseman, I. M. (2010). Aurora B phosphorylates spatially distinct targets to differentially regulate the kinetochore–microtubule interface. *Mol. Cell*, 38(3), 383–392. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2010.02.034>
- West, M. H. P., & Bonner, W. M. (1980). Histone 2B can be modified by the attachment of ubiquitin. *Nucleic Acids Research*, 8(20), 4671–4680. <https://doi.org/10.1093/NAR/8.20.4671>
- Wilkinson, K. A., & Henley, J. M. (2010). Mechanisms, regulation and consequences of protein SUMOylation. *Biochemical Journal*, 428(2), 133–145. <https://doi.org/10.1042/BJ20100158>
- Wilkinson, K. D. (1995). Roles of ubiquitinylation in proteolysis and cellular regulation. *Annual Review of Nutrition*, 15, 161–189. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV.NU.15.070195.001113>
- Worden, E. J., & Wolberger, C. (2019). Activation and regulation of H2B-Ubiquitin-dependent histone methyltransferases. *Current Opinion in Structural Biology*. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2019.05.009>
- Wysocka, J. (2006). Identifying novel proteins recognizing histone modifications using peptide pull-down assay. *Methods (San Diego, Calif.)*, 40(4), 339. <https://doi.org/10.1016/J.YMETH.2006.05.028>
- Yahiro, K., Higashihori, N., & Moriyama, K. (2017). Histone methyltransferase Setdb1 is indispensable for Meckel's cartilage development. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 482(4), 883–888. <https://doi.org/10.1016/J.BBRC.2016.11.128>
- Yamagishi, Y., Honda, T., Tanno, Y., & Watanabe, Y. (2010). Two histone marks establish the inner centromere and chromosome bi-orientation. *Science*, 330(6001), 239–243. <https://doi.org/10.1126/science.1194498>
- Yamano, H., Gannon, J., Mahbubani, H., & Hunt, T. (2004). Cell Cycle-Regulated Recognition of the Destruction Box of Cyclin B by the APC/C in Xenopus Egg Extracts. *Molecular Cell*, 13(1), 137–147. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(03\)00480-5](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(03)00480-5)

- Yang, F., Camp, D. G., Gritsenko, M. A., Luo, Q., Kelly, R. T., Clauss, T. R. W., Brinkley, W. R., Smith, R. D., & Stenoien, D. L. (2007). Identification of a novel mitotic phosphorylation motif associated with protein localization to the mitotic apparatus. *Journal of Cell Science*, *120*(Pt 22), 4060–4070. <https://doi.org/10.1242/JCS.014795>
- Yang, X. J. (2004). Lysine acetylation and the bromodomain: A new partnership for signaling. *BioEssays*, *26*(10), 1076–1087. <https://doi.org/10.1002/BIES.20104>
- Yang, X., Yang, Y., Sun, B.-F., Chen, Y.-S., Xu, J.-W., Lai, W.-Y., Li, A., Wang, X., Bhattarai, D. P., Xiao, W., Sun, H.-Y., Zhu, Q., Ma, H.-L., Adhikari, S., Sun, M., Hao, Y.-J., Zhang, B., Huang, C.-M., Huang, N., ... Yang, Y.-G. (2017). 5-methylcytosine promotes mRNA export-NSUN2 as the methyltransferase and ALYREF as an m⁵C reader. *Cell Research*, *27*, 606–625. <https://doi.org/10.1038/cr.2017.55>
- Yi, X., Jiang, X. J., & Fang, Z. M. (2019). Histone methyltransferase SMYD2: Ubiquitous regulator of disease. *Clinical Epigenetics*, *11*(1), 1–11. <https://doi.org/10.1186/S13148-019-0711-4/FIGURES/4>
- Young, P., Deveraux, Q., Beal, R. E., Pickart, C. M., & Rechsteiner, M. (1998). Characterization of Two Polyubiquitin Binding Sites in the 26 S Protease Subunit 5a. *Journal of Biological Chemistry*, *273*(10), 5461–5467. <https://doi.org/10.1074/JBC.273.10.5461>
- Zakharova, V. V., Magnitov, M. D., Del Maestro, L., Ulianov, S. V., Glentis, A., Uyanik, B., Williard, A., Karpukhina, A., Demidov, O., Joliot, V., Vassetzky, Y. S., Mège, R. D. S. M., Piel, M., Razin, S. V., & Ait-Si-Ali, S. (2022). SETDB1 fuels the lung cancer phenotype by modulating epigenome, 3D genome organization and chromatin mechanical properties. *Nucleic Acids Research*, *50*(8), 4389. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKAC234>
- Zhang, X., Wen, H., & Shi, X. (2012). Lysine methylation: beyond histones. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, *44*(1), 14–27. <https://doi.org/10.1093/ABBS/GMR100>
- Zhang, Y., & Reinberg, D. (2001). Transcription regulation by histone methylation: interplay between different covalent modifications of the core histone tails. *Genes & Development*, *15*(18), 2343–2360. <https://doi.org/10.1101/GAD.927301>
- Zhang, Yuqin, Huang, J., Li, Q., Chen, K., Liang, Y., Zhan, Z., Ye, F., Ni, W., Chen, L., & Ding, Y. (2018). Histone methyltransferase SETDB1 promotes cells proliferation and migration by interacting with Tiam1 in hepatocellular carcinoma. *BMC Cancer*, *18*(1), 539. <https://doi.org/10.1186/s12885-018-4464-9>
- Zhu, B., Zheng, Y., Pham, A. D., Mandal, S. S., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., & Reinberg, D. (2005). Monoubiquitination of human histone H2B: the factors involved and their roles in HOX gene regulation. *Molecular Cell*, *20*(4), 601–611. <https://doi.org/10.1016/J.MOLCEL.2005.09.025>

Zhu, X., Ohtsubo, M., Böhmer, R. M., Roberts, J. M., & Assoian, R. K. (1996). Adhesion-dependent cell cycle progression linked to the expression of cyclin D1, activation of cyclin E-cdk2, and phosphorylation of the retinoblastoma protein. *Journal of Cell Biology*, 133(2), 391–403. <https://doi.org/10.1083/JCB.133.2.391>

7. FIGURE LEGEND

Figure 1: Identification of mitotic progression regulator by MBT pull down

A. Scheme of MBT pull down. B. Venn diagram of protein identified in the MBT pull down. In red proteins are pulled down only in presence of SETDB1. In green proteins pulled down only in absence of SETDB1 and in yellow common proteins. C. Part of the chain analysis on proteins identified only in the presence of SETDB1. D. Gene ontology of proteins identified in MBT pull down

Figure 2: INCENP K84 is methylated by SETDB1

A. Scheme of INCENP functional domains. B. Immunoprecipitation of INCENP (IgG used as negative control) from cytoplasmic (C) or nuclear (N) fractions of MEF followed by Western blot analysis using the antibodies indicated show that the Endogenous INCENP interacts with SETBD1 and seems to be methylated. C. Upper panel: Coomassie blue stained SDS-PAGE of GST-INCENP fusion proteins (numbers: amino acids). Lower panel: autoradiography of in vitro methylation assay with recombinant SETDB1 on the same fusion proteins (arrow shows INCENP 1-150 methylated). D. Upper panel: Coomassie blue stained SDS-PAGE of GST-INCENP fusion proteins (numbers: amino acids, arrow indicates expected size). Lower panel: autoradiography of in vitro methylation assay with recombinant SETDB1 on the same fusion proteins (arrow indicates INCENP 80-150 methylated). E. Upper panel: Coomassie blue stained SDS-PAGE of GST-INCENP fusion proteins (arrow indicates expected size) Lysine are mutated in arginine to avoid methylation by SETDB1. Lower panel: autoradiography of the in vitro methylation test by recombinant SETDB1 on INCENP 80-150 WT and mutants (arrow: expected size).

Figure 3: INCENP K84R methylation mutant showing DNA bridges

A. Quantification of NIH3T3 myc-positive cells 8 h and 24 h post-transfection with INCENP WT-Myc or INCENP K84R-Myc expression vectors. N=3, **, p<0.001., N.S.:

not significant B. Immunofluorescence on NIH3T3 cells transiently transfected with INCENP K84R-Myc (Myc IF in red, arrow shows DNA bridge).

Figure 4: INCENP K84R mutant didn't affect CPC integrity

Western blot analysis of co-immunoprecipitation by Myc Trap[®] technology on cell extracts of NIH3T3 stably inducible expressing the INCENP WT-Myc or INCENP K84R-Myc proteins with doxycycline (16h).

Figure 5: INCENP K84R induce micronuclei and binucleated cell

A. Western blot of endogenous INCENP compared to exogenous one (INCENP-Myc) and loading control (Tubulin). Ratio is shown on the right. B. Phalloidin (middle panel) and DAPI (top panel) staining of cell expressing INCENP K84R after 16h of doxycycline induction. White arrow shows micronuclei and red arrow shows binucleated cell. C. Count of the percentage of NIH3T3 cells showing micronuclei with or without doxycycline induction (N=3; mean cell number per condition=635, ***, $p < 0.0005$, N.S.: not significant). D. Counting the percentage of binucleated NIH3T3 cells with or without doxycycline induction (N=3; mean cell number per condition=635, ***, $p < 0.0005$, N.S.: not significant).

Figure 6: INCENP K84R induce lagging chromosome in anaphase

Images from video microscopy on NIH3T3-H2BGFP cells transfected with INCENP WT (A) or INCENP K84R (B). We observe GFP during anaphase. Arrows show lagging chromosomes given rise to micronuclei formation. C. Counting of the percentage of mitosis showing lagging chromosome in anaphase in NIH3T3 cells expressing INCENP WT or INCENP K84R after 16 h of induction with doxycycline. (N=3, mean number of mitosis: 50, ***, $p < 0.0005$, N.S.: not significant)

Figure 1, Tellier et al.

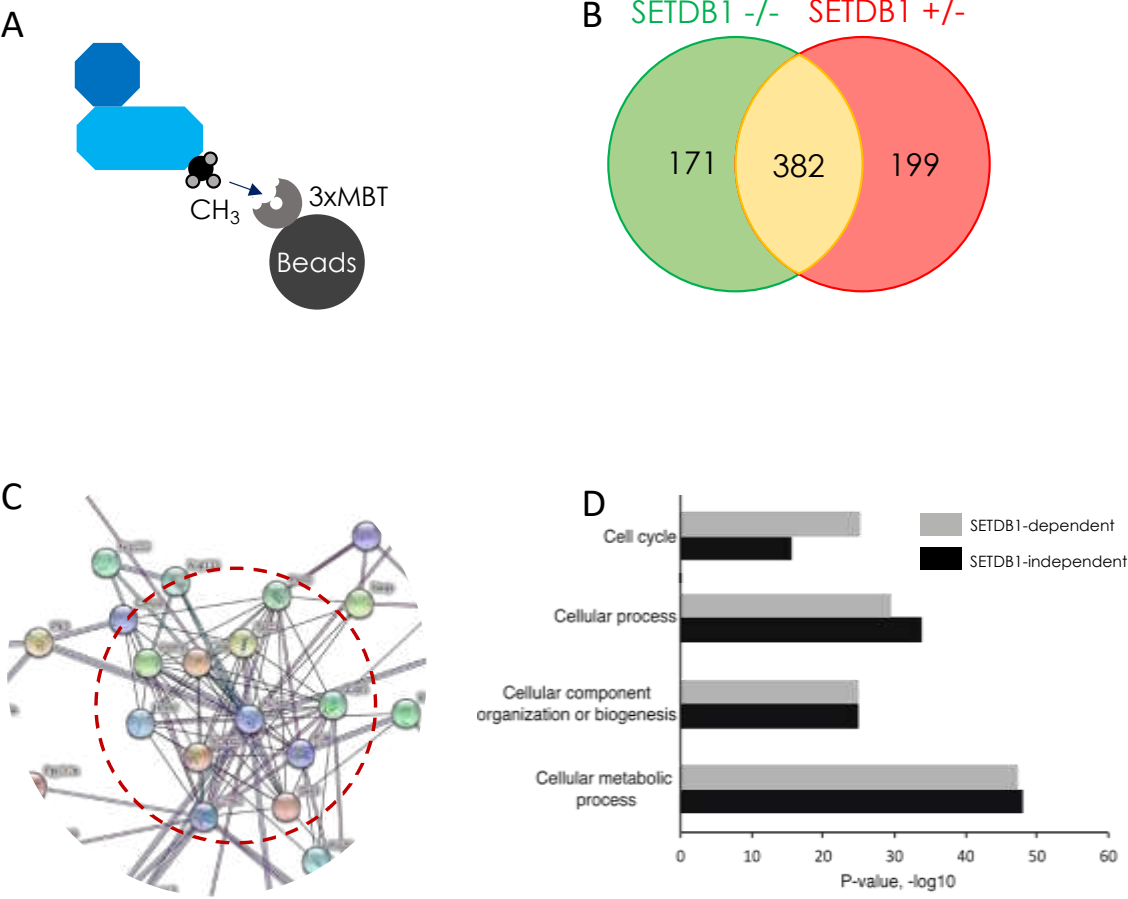


Figure 2, Tellier et al.

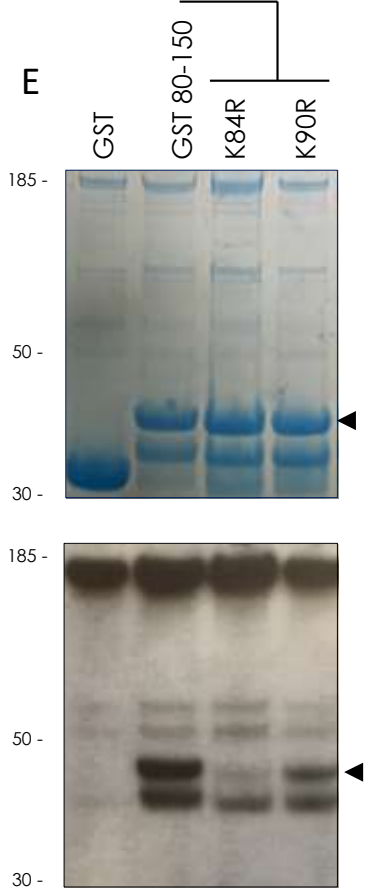
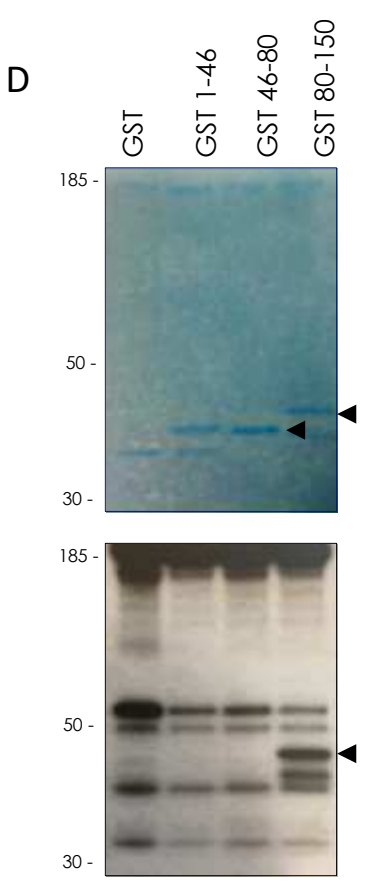
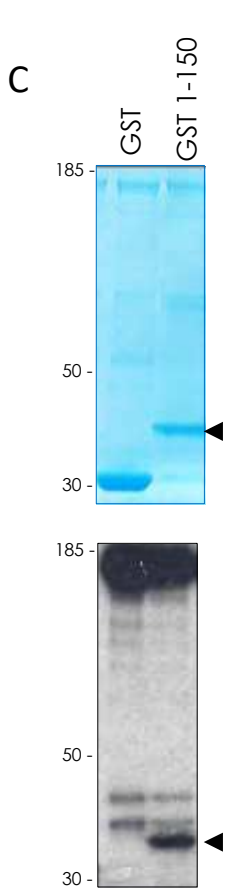
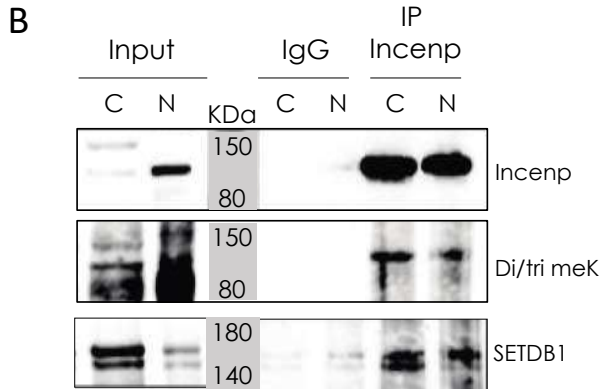


Figure 3, Tellier et al.

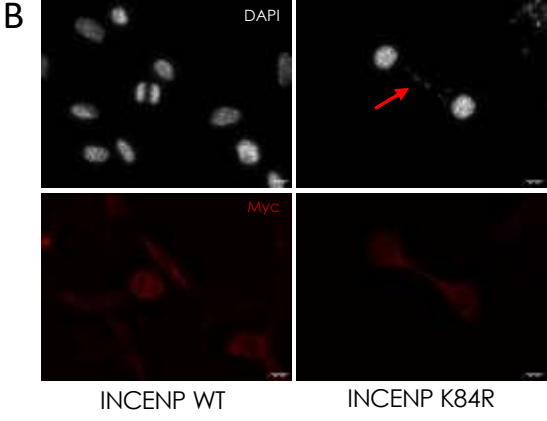
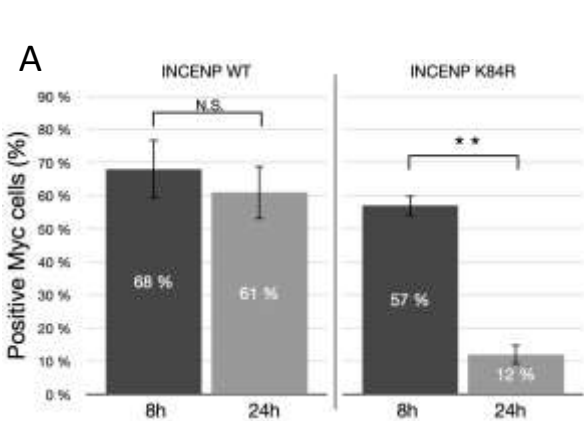


Figure 4, Tellier et al.

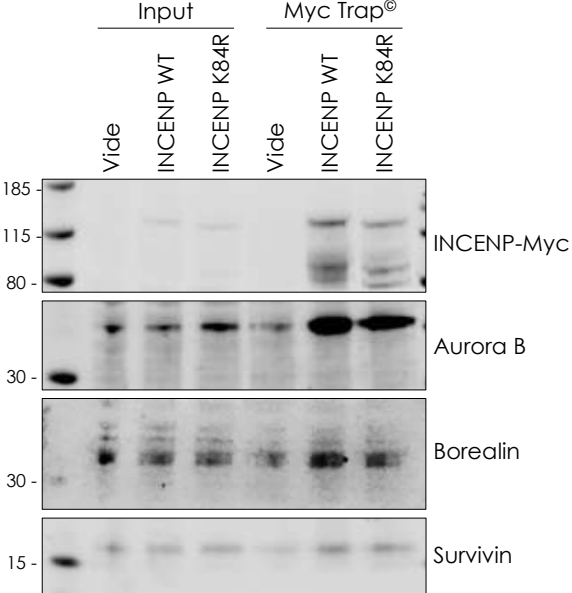


Figure 5, Tellier et al.

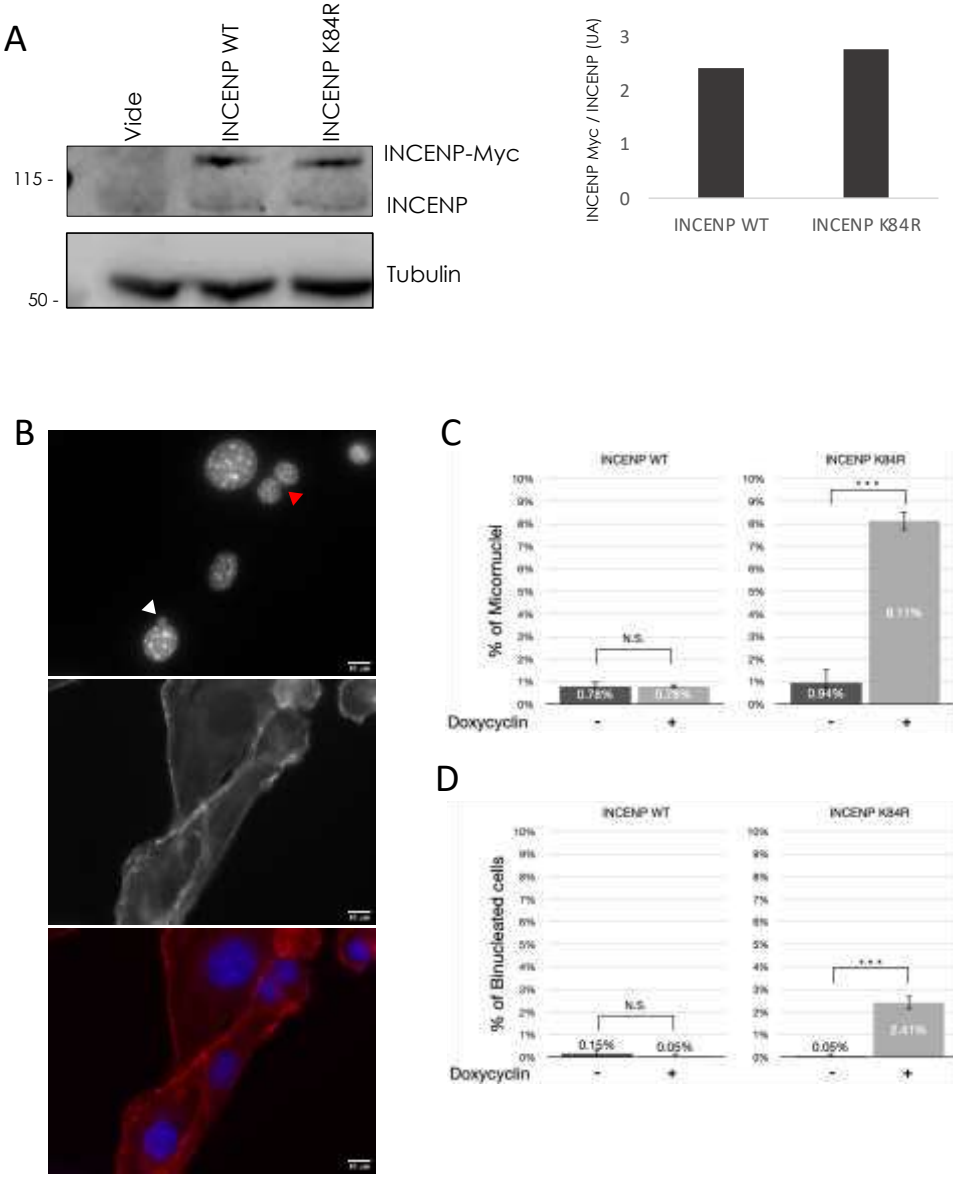
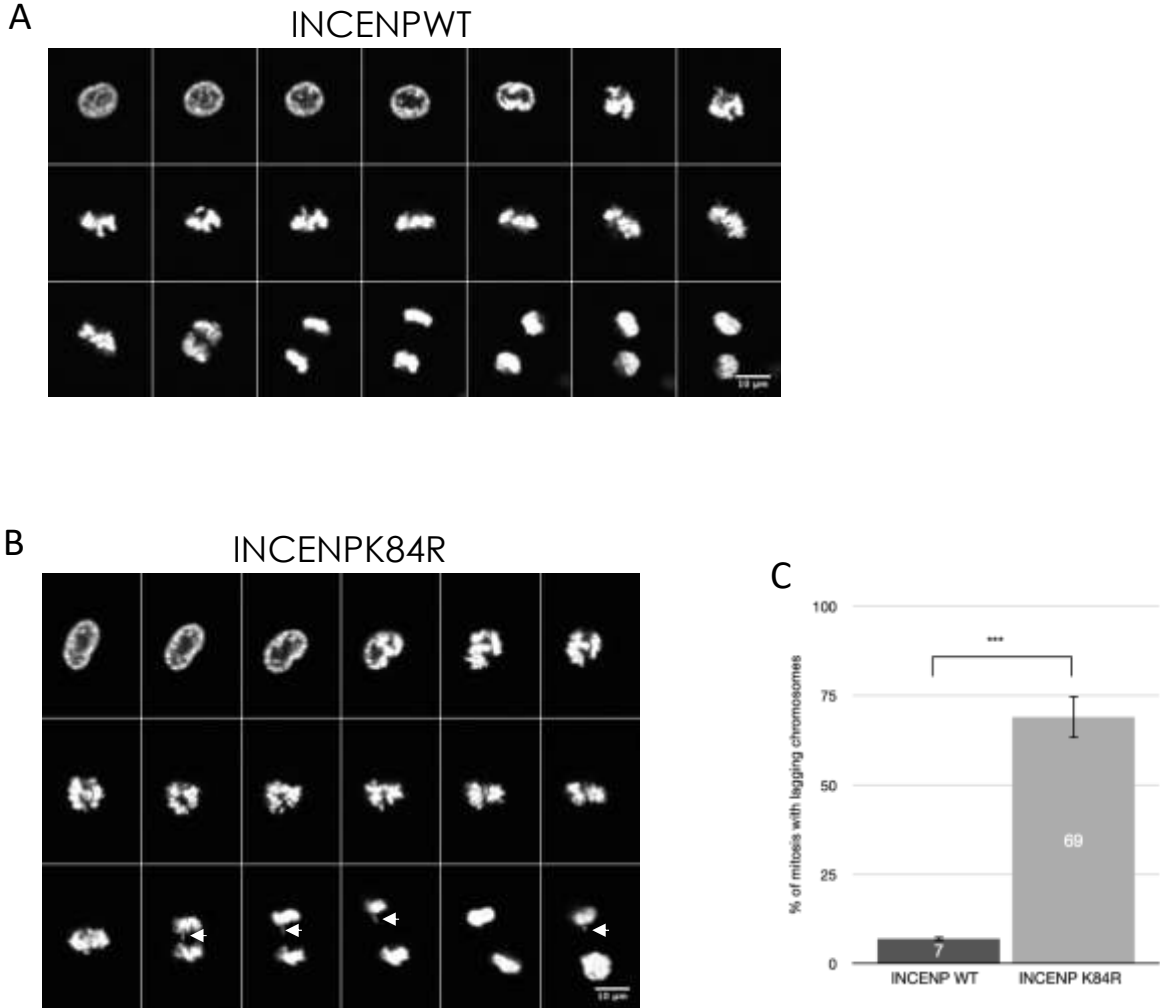


Figure 6, Tellier et al.



DISCUSSION

PARTIE 1 : SETDB1 DANS LA REGULATION DE LA PROGRESSION MITOTIQUE

Durant ma thèse j'ai pu mettre en évidence que SETDB1 pourrait jouer un rôle important dans la progression mitotique à travers la méthylation de la protéine INCENP, une cible non histone, en plus de son rôle premier de méthylation de la lysine 9 de l'histone H3 (H3K9) et de son rôle sur ses substrats non histone déjà connu. Nous avons mis en évidence que SETDB1 méthyle la protéine INCENP, membre du complexe CPC, sur la lysine 84. Cette lysine est essentielle pour la fonction de la protéine INCENP et donc du complexe CPC (Chromosome Passenger Complex). En effet, nous avons pu mettre en évidence qu'un mutant de cette lysine est toxique pour la cellule. Le mutant INCENP K84R induit des défauts mitotiques, comme des chromosomes latents résultant dans la formation de micronoyaux et des cellules binucléées. Cependant, notre étude conserve des zones d'ombre sur le rôle de cette méthylation au cours de la mitose. En effet, le niveau de la méthylation (mono-, di-, tri-), ainsi que sa dynamique (voir ci-après), seront essentiels à étudier pour préciser le rôle de SETDB1 dans la progression mitotique à travers la méthylation de la protéine INCENP.

Nous avons aussi observé que les cellules *SETDB1*^{-/-} possède des défauts de condensation des chromosomes métaphasiques (non montré). Cependant, il est très compliqué de définir les causes précises de ce défaut de condensation à cause des effets pléiotropiques de SETDB1. En effet, un défaut de condensation des chromosomes peut être dû à la fois à une diminution de H3K9me3, ou à la modification de l'expression de certains gènes ou même à l'action de SETDB1 sur plusieurs cibles non histones potentielles.

En plus de notre étude sur l'action de SETDB1 sur INCENP, nos premiers résultats nous ont permis d'identifier un grand nombre de protéines impliquées dans la progression mitotique et dans sa régulation. Ainsi, dans cette partie nous discuterons à la fois de l'approfondissement du rôle de SETDB1 à travers la méthylation de INCENP, mais également comment SETDB1 pourrait agir à travers la méthylation de protéines non histones impliquées dans la progression de la mitose.

1. DYNAMIQUE DE LA METHYLATION DE INCENP PAR SETDB1 DURANT LA MITOSE

La mitose est un processus biologique finement régulé, notamment par de nombreuses modifications post-traductionnelles des protéines impliquées, telles que la phosphorylation ou l'ubiquitination (King et al., 1994). Ces modifications sont très dynamiques et évoluent tout au long de la mitose pour en réguler chaque étape et sont essentielles pour l'intégrité des deux cellules filles. Le rôle de la méthylation dans la mitose est aujourd'hui mis en évidence à travers la méthylation sur arginine (dont les fonctions sont très similaires à la méthylation sur lysine, que nous développerons plus loin dans ce chapitre) mais très peu sur les lysines. En effet, les lysines étant le siège de plusieurs modifications post-traductionnelles (comme l'acétylation ou l'ubiquitination par exemple, *cf* introduction), il est très difficile d'étudier le rôle uniquement de leur méthylation. Cependant, nous avons pu vérifier dans des bases de données que la lysine K84 de INCENP ne subissait pas d'autres modifications post-traductionnelles connues à ce jour.

Nous avons identifié la lysine 84 (K84) de INCENP comme étant méthylée par SETDB1 *in vitro*. Nos résultats ont ensuite montré que cette lysine est essentielle dans la progression mitotique et notamment lors de l'anaphase. Afin de mieux comprendre le rôle de la méthylation de la lysine 84 de INCENP au cours de la progression mitotique, nous souhaitons identifier le niveau de méthylation à l'aide de la spectrométrie de masse. Nous souhaitons immunoprécipiter la protéine INCENP endogène pour vérifier son niveau de méthylation dans des cellules exprimant ou non SETDB1 (*SETDB1*^{+/+} vs *SETDB1*^{-/-}). Ensemble ces analyses pourraient nous permettre d'identifier les niveaux de méthylation que SETDB1 est capable de catalyser (*in vivo*) et si INCENP K84 pourrait être méthylée par d'autres KMTs. En effet, si les analyses de spectrométrie de masse nous permettent d'identifier des lysines méthylées sur INCENP indépendamment de la présence de SETDB1, nous pourrions alors imaginer que INCENP pourrait également être méthylée par d'autres KMTs. Par ailleurs, cela semble être le cas, car dans les bases de données (phosphosite.org), il est montré que les lysine 603 et 604 de INCENP sont méthylées. Nos études préliminaires de méthylation *in vitro* ne nous ont pas permis de montrer que ces méthylations sont catalysées par SETDB1. En parallèle, nous voulons, de la même

manière que lors de ma thèse, réaliser des tests de méthylation *in vitro* afin de vérifier la méthylation ainsi que son niveau (mono-, di-, tri) à l'aide d'une SAM non radioactive. En effet, même *in vitro*, SETDB1 est capable de catalyser les trois niveaux de méthylation. Cependant, la lysine K84 étant dans un environnement riche en lysines/arginines, la méthode classique dite « bottom-up » de digestion à la trypsine qui coupe au niveau des résidus lysine et arginine, ne nous a pas permis de caractériser cette méthylation (**Figure 30A**). La prochaine méthode serait l'approche « top-down » qui consiste à introduire des protéines entières dans la phase gazeuse où elles sont fragmentées et analysées par le spectromètre de masse (**Figure 30B**). Cette approche est utile pour étudier toutes les modifications post-traductionnelles d'une protéine. Cette technique est très robuste lors de l'utilisation d'une seule protéine purifiée. Cette méthode pourra être réalisée après immunoprécipitation de INCENP endogène ou bien en utilisant une protéine INCENP recombinante suivi d'un test de méthylation *in vitro* (Chait, 2006).

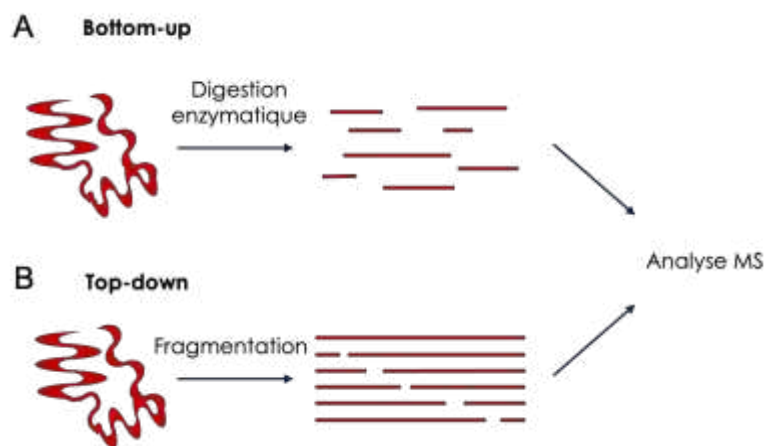


Figure 30 : Comparaison des méthodes bottom-up et top-bottom en spectrométrie de masse

A. Dans une analyse classique en bottom-up, les protéines sont digérées (généralement par la trypsine) ce qui va alors fragmenter la protéine en peptides qui seront alors analysés en spectrométrie de masse. **B.** Dans le cas de la méthode top-bottom, les protéines sont introduites entières dans la phase gazeuse où elles sont alors fragmentées puis analysées par le spectromètre.

Une fois le niveau de méthylation déterminé, nous pourrions produire un anticorps spécifique de la méthylation de la lysine K84 de INCENP et de son niveau de méthylation. Cet anticorps pourrait nous permettre de suivre la dynamique de la méthylation de INCENP au cours de la mitose. Il n'est bien sûr pas exclu que lors de cette dynamique, plusieurs niveaux de méthylation entrent en jeu. Nous devons alors synchroniser les cellules à l'aide d'une méthode n'impactant pas directement le cycle cellulaire, comme par exemple une privation en sérum, et ainsi vérifier l'étape à laquelle a lieu l'établissement de la méthylation de INCENP. Une étude de ce type pourrait nous permettre de préciser la dynamique et la fonction de la méthylation. Nous pourrions, suite à ce type de synchronisation, vérifier à l'aide d'un anticorps spécifique la méthylation à différents moments du cycle cellulaire et de la mitose afin de préciser l'importance de cette méthylation et son rôle potentiel. Malheureusement, de nos jours les anticorps dirigés contre les lysines méthylées n'ont pas une bonne efficacité, et il est très compliqué de suivre cette dynamique sans avoir produit d'anticorps spécifique de la méthylation de INCENP K84. Si les méthodes de synchronisation des cellules nous montrent des résultats satisfaisants, nous pourrions également vérifier si les interactions avec les partenaires de INCENP sont impactées au cours du temps (dépendant de la dynamique de la méthylation). En effet, dans notre étude nous avons seulement vérifié l'intégrité du complexe CPC mais, en fonction de la dynamique de méthylation, nous pourrions étudier si cela impacte les interactions de INCENP avec ses partenaires en réalisant des immunoprécipitations suivies de western blot pour des partenaires connus de INCENP ou en spectrométrie de masse pour vérifier s'il y a un changement de partenaire au cours du cycle.

La méthylation de INCENP par SETDB1 a lieu proche des sites de liaison à la Tubuline, à la Boréoline et à la Survivine. J'ai pu vérifier pendant mes travaux de thèse que le mutant de méthylation de INCENP, INCENP K84R, pouvait toujours interagir avec les membres du complexe CPC, cependant nous n'avons pas pu mettre en évidence si la INCENP K84R interagissait toujours avec la Tubuline. En effet, en utilisant la méthode d'immunoprécipitation, la Tubuline étant très abondante dans les cellules, celle-ci « colle » aux billes d'agarose et est alors détectée par western blot même dans les contrôles IgG. Un biais est également possible car nous n'avons pas inhibé l'expression de INCENP endogène. Nous développerons un peu plus tard dans

la discussion les mécanismes existants mettant en jeu la méthylation dans la progression mitotique.

L'ensemble de ces analyses pourrait alors nous permettre de préciser le rôle de cette méthylation et définir comment cette méthylation pourrait agir dans la dynamique de régulation de INCENP et/ou du CPC dans la régulation de la mitose.

2. SETDB1 METHYLE D'AUTRES PROTEINES ESSENTIELLES A LA PROGRESSION MITOTIQUE

Dans le but d'identifier de nouvelles cibles non histones de SETDB1, nous avons tout d'abord identifié, à l'aide d'une analyse non exhaustive MBT pull-down, un grand nombre de protéines impliquées dans la régulation de la macrostructure des chromosomes en interphase, mais également en mitose. Nous avons notamment pu identifier la protéine CapD2, qui est une protéine membre du complexe Condensine I. Il est connu que CapD2 est méthylée sur arginine mais sa méthylation sur lysine n'est pas connue. Lors de nos premières études au sein du laboratoire pour confirmer les méthylations sur les protéines identifiées dans le MBT pull-down, nous avons en plus de INCENP, pu mettre en lumière que la protéine CapD2 est méthylée sur lysine grâce à un western blot sur cette protéine avec des anticorps pan-méthyl-lysine (CST) qui reconnaissent les lysines di- et tri-méthylées. L'anticorps utilisé est le même que celui utilisé par Cell Signaling lors de leur screening où ils ont précipité des peptides méthylés sur lysine afin de faire une liste non exhaustive de protéines qui sont méthylées sur lysine (utilisé dans la Partie 1 des résultats pour comparer nos résultats de MBT pull-down). Le complexe Condensine I est essentiel dans l'orientation du kinétochore, la condensation des chromosomes et leurs ségrégations durant la mitose.

Comme nous le savons, à travers la méthylation de H3K9, SETDB1 est essentiel dans la condensation des chromosomes. Lorsque l'on inhibe l'expression de SETDB1 les chromosomes mitotiques deviennent plus volumineux et moins condensés durant toute la mitose et on peut observer des chromosomes latents en anaphase ou bien des micronoyaux en fin de mitose. Ce phénotype est également un observé dans des cellules dans lesquelles nous avons inhibé, à l'aide de siARNs, la

protéine CapD2 (**Figure 31**) ou bien d'autres membres du complexe Condensine I. Il serait intéressant de réaliser une étude similaire que celle que j'ai pu réaliser pour la méthylation de INCENP. En effet, on remarque que la mauvaise condensation des chromosomes métaphasiques pour les cellules *CapD2* KO est un phénotype que l'on peut également observer pour des cellules *SETDB1* KO. Nous pouvons donc nous poser la question si ce phénotype observé pour les cellules *SETDB1* KO est dû uniquement à un défaut de méthylation de H3K9 ou bien si cela peut également être dû à la méthylation de CapD2 par SETDB1.

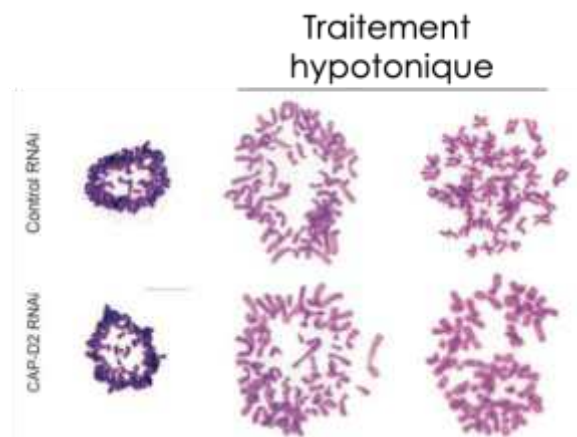


Figure 31 : Importance de CapD2 dans la condensation des chromosomes métaphasiques

En absence de la protéine CapD2, les chromosomes métaphasiques sont moins condensés que dans la condition contrôle. (Hirota et al., 2004)

Nous avons également identifié par MBT pull-down de nombreuses protéines impliquées dans la mitose, tels que la Séparase ou des membres du complexe APC/C. Cela renforce le fait que SETDB1 pourrait jouer un rôle majeur dans la progression mitotique et sa régulation. Les limites de la technique de MBT pull-down sont que nous identifions à la fois des protéines méthylées sur lysine mais également leurs partenaires, il sera donc important pour chaque protéine de bien vérifier qu'elle est méthylée. Une étude de l'institut Pasteur sur les protéines impliquées dans la séparation des cellules filles à la fin de la cytokinèse, notamment grâce au corps central (midbody) dont un des complexes majeurs est le complexe CPC, a tenté

d'identifier l'ensemble des protéines présentes au niveau de ce corps central. Cette zone autour du corps central est appelée le Flemmingsome (autre nom du midbody, nom donnée en l'honneur de Walter Flemming , premier à décrire le corps central en 1891 (Addi et al., 2020; Flemming, 1891; Paweletz, 2001)). L'étude a permis de faire une base de données regroupant l'ensemble des protéines présentes dans ce Flemmingsome. Dans cette base de données nous pouvons retrouver SETDB1 sans pour autant connaître le rôle qu'elle pourrait avoir dans cette zone. Néanmoins, bien que SETDB1 soit détectée dans le Flemmingsome, elle n'y est pas enrichie, SETDB1 ne se concentre pas de façon spécifique dans ce Flemmingsome (Addi et al., 2020).

3. LA METHYLATION DANS LA REGULATION DU CYCLE CELLULAIRE

Depuis de nombreuses années, la méthylation sur arginine est connue comme une marque très présente dans la régulation du cycle cellulaire. Les arginines méthyltransférase PRMT (Protein arginine methyltransferase) sont connues pour également avoir une localisation cytoplasmique. Plus précisément, certaines PRMTs sont impliquées dans la progression mitotique comme par exemple la méthylation par PRMT1 de l'arginine de la protéine 2-like associée à l'ubiquitine (UBAP2L, dont les fonctions physiologiques sont très peu connues à ce jour), est nécessaire à la progression de la mitose en régulant l'alignement et la distribution des chromosomes. Cette méthylation modifie l'affinité de UBAP2L pour certains ARNs (non codants) essentiels dans la régulation de la mitose (C. Huang et al., 2019).

Par ailleurs PRMT1 est également capable de méthyler la protéine INCENP sur l'arginine 887. Cette méthylation est d'une importance cruciale pour la ségrégation chromosomique et la division cellulaire. Il est important de noter que l'arginine 887 est située dans le domaine IN-box, qui est connu pour lier et activer Aurora B. Parmi diverses espèces, l'arginine 887 est bien conservée et proche d'un motif TSS (thréonine-sérine-sérine) C-terminal qui comprend deux résidus sérine conservés et phosphorylés par Aurora B. Cette phosphorylation du motif TSS active en outre Aurora B dans une boucle de rétroaction positive, ce qui implique que la méthylation de

INCENP sur R887 par PRMT1 est susceptible d'être un déclencheur de l'activation de Aurora B et que la méthylation de l'arginine 887 est essentielle pour l'interaction avec Aurora B. La méthylation de INCENP établie par PRMT1 sur l'arginine 887 semble être un régulateur clé de l'activation de Aurora B. Cette étude a été la première à mettre en évidence une méthylation essentielle dans l'action de INCENP (Deng et al., 2015).

En plus des arginines méthyltransférases, une méthyltransférase a également été identifiée comme importante dans la progression mitotique. SMYD2, qui possède de nombreuses cibles telles que Rb, p53, STAT3 ou NF- κ B (pour revue (Yi et al., 2019)) est capable de méthyler la lysine K394 de l' α -tubuline. Cette méthylation stabilise les microtubules, dont la dynamique doit être finement régulée durant la mitose. Cette méthylation est permise grâce à l'interaction entre SMYD2 et CDK4/6 (Li et al., 2020).

Pour conclure, le rôle de la méthylation sur lysines est de plus en plus étudié de nos jours et, à l'instar des arginines méthyltransférases ou de SMYD2, la protéine SETDB1 de par sa localisation cytoplasmique et de toutes ses cibles non histones potentielles, avec notamment des protéines impliquées dans la mitose comme INCENP, pourrait jouer un rôle central dans la progression mitotique. SETDB1 est également une protéine très largement dérégulée dans les cancers. Depuis de nombreuses années, les études se concentrent sur les rôles de SETDB1 via la méthylation de H3K9. Notre étude a ainsi pu ouvrir un nouvel axe sur l'étude de l'implication de SETDB1 à travers un rôle inhabituel dans la progression mitotique, qui est également très largement dérégulée dans les cancers. Cela pourrait servir notamment comme base pour un nouveau travail sur les mécanismes impliqués dans la tumorigenèse, et générer de nouvelles pistes précieuses pour développer de nouvelles applications diagnostiques et/ou thérapeutiques anti-cancéreuses.

PARTIE 2 : LES CIBLES NON HISTONES DE SETDB1 : DISCUSSION DES ETUDES DE METHYLOME PAR PROTEOMIQUE

Afin de pouvoir identifier de nouvelles cibles non histones pour SETDB1, nous avons décidé de réaliser un crible non exhaustif du méthylome lysine dépendant de SETDB1. Ce méthylome a été réalisé dans des cellules murines (fibroblaste et cellules souches embryonnaires). Nous avons d'une part, identifié de nombreuses protéines impliquées dans la régulation de la progression mitotique et discutées ci-dessus. D'autre part, nous avons aussi mis en évidence un grand nombre de protéines impliquées dans la régulation des ARN et plus précisément dans les mécanismes d'export nucléaire de l'ARNm et dans la traduction. Enfin, un dernier groupe de protéines impliquées dans les régulations des signaux intra et extra cellulaires. Nous discuterons de ce point dans le dernier paragraphe de cette partie.

1. IMPLICATION DE SETDB1 DANS LES REGULATIONS DES ARN

Nous avons pu identifier grâce à la recherche non exhaustive de cibles non histones que SETDB1 pourrait avoir un rôle essentiel dans la régulation de la traduction. En parallèle de ces cribles, des études menées au sein du laboratoire sur le rôle de SETDB1 dans le cytoplasme (résultats non publiés (Rapone et al., 2022)) ont permis de montrer que SETDB1 influence positivement la traduction et régule le pool d'ARNs cytoplasmiques. La recherche de partenaires cytoplasmiques par un crible double hybride chez la levure a permis d'identifier Trim71, une Ubiquitine E3 ligase, impliquée dans la régulation post-transcriptionnelle de l'expression des gènes. D'une façon intéressante, Trim71 est spécifiquement exprimée dans les cellules souches embryonnaires de souris pour lesquelles l'expression de SETDB1 est essentielle. Roberta Rapone au laboratoire a pu montrer que SETDB1 et Trim71 interagissent et co-localisent au niveau des « P-bodies » impliqués dans la régulation

de la disponibilité des ARNm. L'analyse comparative des transcriptomes lors d'expériences de perte de fonction de SETDB1 ou de Trim71 dans les cellules ES montre la dérégulation de gènes communs ce qui suggère une inter-relation de ces deux partenaires dans la régulation des pools d'ARNm. L'étude protéomique comparative des partenaires de Trim71 en absence ou présence de SETDB1 montre que SETDB1 influence la composition des complexes protéiques contenant Trim71. L'ensemble de ces résultats indique qu'une fonction essentielle de SETDB1 cytoplasmique s'exerce à un niveau post-transcriptionnel de la régulation de l'expression génique et pourrait s'expliquer, au moins en partie, par l'interaction avec le *silencer* d'ARNm spécifique des cellules ES, Trim71 (bien qu'aucune méthylation directe n'a pu être mise en évidence). Ces données révèlent un rôle de SETDB1 dans la régulation post-transcriptionnelle de l'expression génique et suggèrent que les dérégulations cytoplasmiques, causées par la perte des fonctions de SETDB1 cytoplasmique, puissent affecter l'identité et la survie des cellules ES.

Cependant, dans cette étude, la problématique de la méthylation directe de SETDB1 sur des substrats non histones n'est pas abordée. Grâce aux résultats obtenus dans la recherche de cibles non histones cytoplasmiques de SETDB1, nous avons pu identifier certaines protéines qui pourraient être directement méthylées par SETDB1. Il apparaît clairement que SETDB1 semble avoir un rôle majeur dans la traduction, mais ceci n'est que peu connu de nos jours. Grâce à l'analyse PTMScan/SILAC nous avons pu identifier des protéines impliquées majoritairement dans la traduction, mais cette analyse n'était pas totalement satisfaisante avec un nombre très faible de protéines identifiées. Cependant, grâce à l'étude par MBT pull-down d'extraits nucléaires et cytoplasmiques, l'implication de SETDB1 dans la traduction, la régulation et la stabilité des ARN ressort assez clairement. Cet impact pourrait être dû à deux actions distinctes de SETDB1, à la fois un rôle de méthylation de protéines non histones, mais également dans la possible reconnaissance de l'ARN méthylé.

Nous développerons dans cette partie quel pourrait être le rôle de l'action méthyltransférase de SETDB1 dans la régulation de la traduction, puis nous nous intéresserons à l'action possible de SETDB1 directement sur l'ARN.

1.1. Méthylation par SETDB1 de complexes régulant la traduction ?

Un des principaux candidats en tant que nouvelle cible de SETDB1 est la protéine Eif3c (eukaryotic translation initiation factor 3 c), qui est un facteur d'initiation de la traduction. En effet, les premiers résultats obtenus par MBT pull-down cytoplasmique ont identifié certains membres du complexe Eif-3 avec notamment les protéines Eif3c et Eif3a. Tout d'abord, en recherchant si ces deux protéines avaient été identifiées auparavant comme méthylées sur lysine, il est apparu que la protéine Eif3a est mono-méthylée sur les lysines 13 (K13) et 559 (K559). Ces deux méthylations sont catalysées par la protéine SMYD2, cependant la fonction de ces méthylations n'est pas connue (J. B. Olsen et al., 2016). Des tests de méthylation *in vitro* effectué au sein de notre laboratoire semble indiquer que SETDB1 serait capable de méthyler la protéine Eif3c. Dans les bases de données, il est connu que la forme humaine de Eif3c est méthylée sur arginine (R), mais il n'y aucune information concernant sa méthylation sur lysine. Eif3c étant une protéine formant de nombreux complexes essentiels à son activité, et si nous prenons en compte le rôle de la méthylation sur lysine dans l'interaction protéine-protéine, une potentielle méthylation de cette protéine par SETDB1 pourrait jouer un rôle clé dans l'action de Eif3c.

D'un autre côté, dans le MBT pull-down nucléaire, nous avons identifié un ensemble de protéines impliquées dans l'export de l'ARN messenger du noyau vers le cytoplasme et dans l'épissage. On retrouve notamment la protéine Chtop (chromatin target of PRMT1 protein) du complexe TREX (TRanscription-Export) et appartenant au sous complexe THO. Cette protéine est connue pour son rôle dans l'export de l'ARNm. La protéine Chtop est connue pour interagir de façon dépendante de la méthylation avec des lysines méthyltransférases tel que SET1, une méthyltransférase de la lysine 4 de l'histone H3 (Takai et al., 2014). Ainsi, l'interaction entre SETDB1 et ce complexe pourrait alors être vérifiée par co-immunoprécipitation (Figure 32).

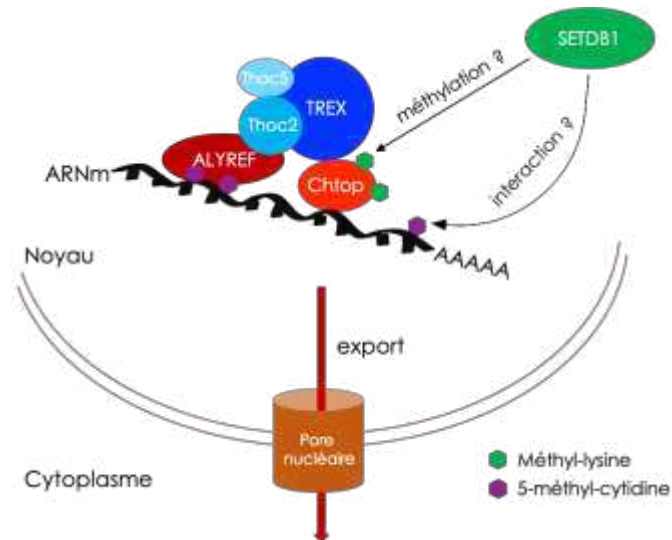


Figure 32 : Hypothèse du potentiel rôle de SETDB1 sur l'export des ARNm

SETDB1 pourrait reconnaître la protéine Chtop soit directement soit grâce aux méthylation par l'intermédiaire du domaine tudor. Elle pourrait aussi se lier l'ARN méthylé à l'aide de son domaine MBD cela lui permettrait alors de méthyler les protéines du complexe Tho/TREX tel que la protéine Chtop.

De plus, le complexe TREX qui agit dans l'export nucléaire des ARNm est régulé par la méthylation de la m6A (N⁶-Methyladenosine), une des modifications de l'ARNm les plus abondantes chez les eucaryotes (Chang et al., 2013). SETDB1 serait-elle capable de reconnaître l'ARN méthylé via son domaine putatif MBD ?

1.2. Reconnaissance de l'ARN méthylé par SETDB1 ?

Les protéines capables de se lier à l'ARN double ou simple brin, connues sous le nom de RBP (RNA binding-proteins) possèdent généralement des motifs de reconnaissance de l'ARN (RRM, RNA Recognition Motif). Ces motifs sont principalement des motifs structuraux. Ces protéines sont essentielles dans les modifications post-transcriptionnelles de l'ARN, dans l'épissage, dans le transport et la localisation des ARN et dans la traduction. Toutes ces protéines possèdent une activité de liaison à l'ARN mais ont également la capacité de former de nombreux complexes (dont de nombreuses interactions sont dépendantes de la méthylation à la fois de l'ARN et/ou des protéines). Dans notre cas, SETDB1 ne contient a priori pas

de motifs structuraux capables de lier l'ARN, mais pourrait jouer un rôle essentiel dans les interactions protéines-protéines dépendantes de la méthylation.

Bien qu'il n'existe aucune méthode prédictive permettant de penser que SETDB1 serait capable d'interagir directement avec l'ARN, il reste la possibilité que SETDB1 soit capable de reconnaître l'ARN *via* son domaine MBD. En 2004, Jeffery et al., ont mis en évidence que les protéines MBD et plus précisément les protéines MBD2 (Methyl-CpG Binding Domain Protein 2) et MeCP2 (methyl CpG binding protein 2) ont une forte affinité pour l'ARN, ces protéines sont capables de former des complexes ARN/protéines avec les ARNm (Jeffery & Nakielnny, 2004). SETDB1 possède un domaine MBD mais aucune recherche n'a pu mettre en évidence une interaction entre SETDB1 et l'ADN méthylé. Il serait alors intéressant de vérifier la potentielle fonction du domaine MBD de SETDB1 à l'aide d'un test d'interaction ARN-protéine *in vitro*. Ces analyses pourraient mettre en évidence un nouveau mécanisme d'action de SETDB1 sur la traduction des ARNm.

L'ARN peut également être modifié après avoir été transcrit. L'une des modifications de l'ARN la plus étudiée est la méthylation de l'ARN. L'ARN peut en effet être méthylé sur différents sites et le donneur de méthyl est, comme pour la méthylation des protéines, la S-adénosylméthionine. On distingue les méthylations sur les adénosines – N¹-methyladenosine, N⁶-methyladenosine –, la 2'-O-méthylation et la 5-methylcytidine. On remarque que la 5-methylcytosine (la base nucléique de la 5-methylcytidine) est une marque qui est également présente sur l'ADN reconnu par les protéines possédant un domaine MBD (methyl binding domain). La 5-methylcytidine est essentielle dans l'export nucléaire de l'ARNm et est reconnue par ALYREF, une sous unité du complexe TREX (X. Yang et al., 2017). Là encore, SETDB1 pourrait alors jouer un rôle essentiel dans l'export nucléaire des ARNm à travers la reconnaissance de l'ARNm méthylé et pourrait ainsi être « ciblée » pour méthyler des substrats non histones (comme la protéine Chtop) permettant l'établissement du complexe TREX ou en assurant sa stabilité (Figure 32).

Pour conclure, les résultats obtenus en recherchant des nouvelles cibles non histones de SETDB1 et l'analyse de l'état de l'art dans le domaine de la traduction et de l'export nucléaire des ARNm, suggèrent que SETDB1 pourrait jouer un rôle dans la régulation de ces différents processus à travers la méthylation de protéines non

histones, mais également en interagissant directement avec l'ARNm. Ces hypothèses pourraient être étudiées dans un nouveau projet et pourraient mettre en lumière une toute nouvelle fonction de la protéine SETDB1.

2. SETDB1 DANS LA SIGNALISATION INTRACELLULAIRE

Au sein de notre laboratoire, une récente étude a mis en évidence un lien étroit entre SETDB1 et la voie Wnt/ β -caténine dans la différenciation musculaire. La relocalisation dépendante de Wnt de SETDB1 pourrait être un mécanisme général dans la prolifération et la différenciation des cellules. Cependant, cette étude s'est concentrée sur l'action épigénétique de SETDB1. En plus de son rôle important dans le développement embryonnaire et l'auto-renouvellement homéostatique dans les tissus adultes, la signalisation Wnt/ β -caténine exerce à la fois des fonctions anti-inflammatoires et pro-inflammatoires. Ceci est, au moins partiellement, dû à la répression ou à l'activation de la voie NF- κ B. De même, la voie NF- κ B régule positivement ou négativement la signalisation Wnt/ β -caténine. Différents composants des deux voies sont impliqués dans ce dialogue, formant un réseau de régulation complexe. Nous avons pu identifier lors de la recherche de cible non histones cytoplasmiques de SETDB1 des acteurs de la voie NF- κ B. Notamment, nous avons pu identifier la protéine NFKB2 (Nuclear factor NF-kappa-B p100 subunit) possédant une répétition de domaines ankyrines. Ces domaines ankyrines sont très intéressants car ce sont des domaines permettant notamment de reconnaître les lysines méthylées et sont des domaines présents sur les KMTs de H3K9 G9A et GLP. Nous pouvons alors imaginer que cette protéine a alors été précipitée avec des protéines méthylées sur lysines et/ou peut-être elle-même méthylée par SETDB1.

Pour conclure, mes travaux de thèse ont pu mettre en lumière l'importance que peut avoir SETDB1 à travers ses cibles non histones en plus de la méthylation de H3K9. J'ai pu montrer l'impact qu'il pourrait avoir dans la régulation de la progression mitotique, bien qu'il reste encore à comprendre la dynamique de cette méthylation. Mais, en plus de ce travail effectué sur la protéine INCENP, j'ai pu voir qu'il reste un grand nombre de processus dans lesquels pourrait intervenir SETDB1 à travers les

méthylations sur lysine. En effet, j'ai pu définir que SETDB1 pourrait méthyler des protéines impliquées dans la régulation des ARNm ou bien dans certaines voies de signalisation. Tous ces travaux pourront donc être continués par mon laboratoire d'accueil.

RÉFÉRENCES

- Abe, S., Nagasaka, K., Hirayama, Y., Kozuka-Hata, H., Oyama, M., Aoyagi, Y., Obuse, C., & Hirota, T. (2011). The initial phase of chromosome condensation requires Cdk1-mediated phosphorylation of the CAP-D3 subunit of condensin II. *Genes & Development*, 25(8), 863–874. <https://doi.org/10.1101/GAD.2016411>
- Abe, Y., Sako, K., Takagaki, K., Hirayama, Y., Uchida, K. S. K., Herman, J. A., DeLuca, J. G., & Hirota, T. (2016). HP1-Assisted Aurora B Kinase Activity Prevents Chromosome Segregation Errors. *Developmental Cell*, 36(5), 487–497. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2016.02.008>
- Adams, R. R., Wheatley, S. P., Gouldsworthy, A. M., Kandels-Lewis, S. E., Carmena, M., Smythe, C., Gerloff, D. L., & Earnshaw, W. C. (2000a). INCENP binds the Aurora-related kinase AIRK2 and is required to target it to chromosomes, the central spindle and cleavage furrow. *Current Biology*, 10(17), 1075–1078. [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(00\)00673-4](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(00)00673-4)
- Adams, R. R., Wheatley, S. P., Gouldsworthy, A. M., Kandels-Lewis, S. E., Carmena, M., Smythe, C., Gerloff, D. L., & Earnshaw, W. C. (2000b). INCENP binds the Aurora-related kinase AIRK2 and is required to target it to chromosomes, the central spindle and cleavage furrow. *Curr. Biol.*, 10(17), 1075–1078. [https://doi.org/10.1016/s0960-9822\(00\)00673-4](https://doi.org/10.1016/s0960-9822(00)00673-4)
- Addi, C., Presle, A., Frémont, S., Cuvelier, F., Rocancourt, M., Milin, F., Schmutz, S., Chamot-Rooke, J., Douché, T., Duchateau, M., Gai Gianetto, Q., Salles, A., Ménager, H., Matondo, M., Zimmermann, P., Gupta-Rossi, N., & Echard, A. (2020). The Flemmingsome reveals an ESCRT-to-membrane coupling via ALIX/syntenin/syndecan-4 required for completion of cytokinesis. *Nature Communications*, 11(1). <https://doi.org/10.1038/S41467-020-15205-Z>
- Ainsztein, A. M., Kandels-Lewis, S. E., Mackay, A. M., & Earnshaw, W. C. (1998). INCENP centromere and spindle targeting: Identification of essential conserved motifs and involvement of heterochromatin protein HP1. *Journal of Cell Biology*, 143(7), 1763–1774. <https://doi.org/10.1083/jcb.143.7.1763>
- Ait-Si-Ali, S., Guasconi, V., Fritsch, L., Yahi, H., Sekhri, R., Naguibneva, I., Robin, P., Cabon, F., Poleskaya, A., & Harel-Bellan, A. (2004). A Suv39h-dependent mechanism for silencing S-phase genes in differentiating but not in cycling cells. *The EMBO Journal*, 23(3), 605. <https://doi.org/10.1038/SJ.EMBOJ.7600074>
- ALLFREY, V. G., FAULKNER, R., & MIRSKY, A. E. (1964). ACETYLATION AND METHYLATION OF HISTONES AND THEIR POSSIBLE ROLE IN THE. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States Of*, 51, 786–794. <https://doi.org/10.1073/PNAS.51.5.786/ASSET/8C54DEE7-DD18-4CC2-86A1-BD41B3751D13/ASSETS/PNAS.51.5.786.FP.PNG>
- Alushin, G. M., Ramey, V. H., Pasqualato, S., Ball, D. A., Grigorieff, N., Musacchio, A., & Nogales, E. (2010). The Ndc80 kinetochore complex forms oligomeric arrays along microtubules. *Nature* 2010 467:7317, 467(7317), 805–810. <https://doi.org/10.1038/nature09423>

- Ambler, R. P., & Rees, M. W. (1959). Epsilon-N-Methyl-lysine in bacterial flagellar protein. *Nature*, *184*(4679), 56–57. <https://doi.org/10.1038/184056B0>
- Ambrosini, G., Adida, C., & Altieri, D. C. (1997). A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma. *Nature Med.*, *3*(8), 917–921. <https://doi.org/10.1038/nm0897-917>
- Bannister, A. J., & Kouzarides, T. (1996). The CBP co-activator is a histone acetyltransferase. *Nature* *1996* *384:6610*, *384*(6610), 641–643. <https://doi.org/10.1038/384641a0>
- Bannister, A. J., & Kouzarides, T. (2011). Regulation of chromatin by histone modifications. *Cell Research*, *21*(3), 381–395. <https://doi.org/10.1038/CR.2011.22>
- Batham, J., Lim, P. S., & Rao, S. (2019). SETDB-1: A potential epigenetic regulator in breast cancer metastasis. In *Cancers* (Vol. 11, Issue 8). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/cancers11081143>
- Bazile, F., St-Pierre, J., & D'Amours, D. (2010). Three-step model for condensin activation during mitotic chromosome condensation. <Http://Dx.Doi.Org/10.4161/Cc.9.16.12620>, *9*(16), 3263–3275. <https://doi.org/10.4161/CC.9.16.12620>
- Beyer, S., Pontis, J., Schirwis, E., Battisti, V., Rudolf, A., Le Grand, F., & Ait-Si-Ali, S. (2016). Canonical Wnt signalling regulates nuclear export of Setdb1 during skeletal muscle terminal differentiation. *Cell Discovery*, *2*, 16037. <https://doi.org/10.1038/celldisc.2016.37>
- Bilodeau, S., Kagey, M. H., Frampton, G. M., Rahl, P. B., & Young, R. A. (2009). SetDB1 contributes to repression of genes encoding developmental regulators and maintenance of ES cell state. *Genes & Development*, *23*(21), 2484–2489. <https://doi.org/10.1101/GAD.1837309>
- Blanc, R. S., & phane Richard, S. (2017). Molecular Cell Review Arginine Methylation: The Coming of Age. *Molecular Cell*, *65*, 8–24. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2016.11.003>
- Brosh, R., & Rotter, V. (2009). When mutants gain new powers: news from the mutant p53 field. *Nature Reviews. Cancer*, *9*(10), 701–713. <https://doi.org/10.1038/NRC2693>
- Brotelle, T., & Bay, J. O. (2016). La voie de signalisation PI3K-AKT-mTOR : description, développement thérapeutique, résistances, marqueurs prédictifs/pronostiques et applications thérapeutiques en cancérologie. *Bulletin Du Cancer*, *103*(1), 18–29. <https://doi.org/10.1016/J.BULCAN.2015.09.011>
- Bulut-Karslioglu, A., DeLaRosa-Velázquez, I. A., Ramirez, F., Barenboim, M., Onishi-Seebacher, M., Arand, J., Galán, C., Winter, G. E., Engist, B., Gerle, B., O'Sullivan, R. J., Martens, J. H. A., Walter, J., Manke, T., Lachner, M., & Jenuwein,

- T. (2014). Suv39h-Dependent H3K9me3 Marks Intact Retrotransposons and Silences LINE Elements in Mouse Embryonic Stem Cells. *Molecular Cell*, 55(2), 277–290. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2014.05.029>
- Callebaut, I., & Mornon, J. P. (1997). The human EBNA-2 coactivator p100: multidomain organization and relationship to the staphylococcal nuclease fold and to the tudor protein involved in *Drosophila melanogaster* development. *Biochem. J*, 321, 125–132.
- Cao, N., Yu, Y., Zhu, H., Chen, M., Chen, P., Zhuo, M., Mao, Y., Li, L., Zhao, Q., Wu, M., & Ye, M. (2020). SETDB1 promotes the progression of colorectal cancer via epigenetically silencing p21 expression. *Cell Death and Disease*, 11(5), 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41419-020-2561-6>
- Cao, R., Tsukada, Y. I., & Zhang, Y. (2005). Role of Bmi-1 and Ring1A in H2A ubiquitylation and Hox gene silencing. *Molecular Cell*, 20(6), 845–854. <https://doi.org/10.1016/J.MOLCEL.2005.12.002>
- Capalbo, L., Montembault, E., Takeda, T., Bassi, Z. I., Glover, D. M., & D'Avino, P. P. (2012). The chromosomal passenger complex controls the function of ESCRT-III Snf7 proteins during cytokinesis. *Open Biology*, 2(MAY), 120070. <https://doi.org/10.1098/rsob.120070>
- Cardoso, M. C., Leonhardt, H., & Nadal-Ginard, B. (1993). Reversal of terminal differentiation and control of DNA replication: Cyclin A and cdk2 specifically localize at subnuclear sites of DNA replication. *Cell*, 74(6), 979–992. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(93\)90721-2](https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90721-2)
- Carlson, S. M., & Gozani, O. (2014). Emerging technologies to map the protein methylome. In *Journal of Molecular Biology* (Vol. 426, Issue 20, pp. 3350–3362). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2014.04.024>
- Carmena, M., Ruchaud, S., & Earnshaw, W. C. (2009). Making the Auroras glow: regulation of Aurora A and B kinase function by interacting proteins. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 21(6), 796–805. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2009.09.008>
- Carmena, M., Wheelock, M., Funabiki, H., & Earnshaw, W. C. (2012). The chromosomal passenger complex (CPC): from easy rider to the godfather of mitosis. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 13(12), 789–803. <https://doi.org/10.1038/nrm3474>
- Castro, A., Bernis, C., Vigneron, S., Labbé, J. C., & Lorca, T. (2005). The anaphase-promoting complex: a key factor in the regulation of cell cycle. *Oncogene* 2005 24:3, 24(3), 314–325. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1207973>
- Ceol, C. J., Houvras, Y., Jane-Valbuena, J., Bilodeau, S., Orlando, D. A., Battisti, V., Fritsch, L., Lin, W. M., Hollmann, T. J., Ferré, F., Bourque, C., Burke, C. J., Turner, L., Uong, A., Johnson, L. A., Beroukhim, R., Mermel, C. H., Loda, M., Ait-Si-Ali, S., ... Zon, L. I. (2011a). The histone methyltransferase SETDB1 is recurrently amplified in melanoma and accelerates its onset. *Nature*, 471(7339), 513–517.

<https://doi.org/10.1038/nature09806>

- Ceol, C. J., Houvras, Y., Jane-Valbuena, J., Bilodeau, S., Orlando, D. A., Battisti, V., Fritsch, L., Lin, W. M., Hollmann, T. J., Ferré, F., Bourque, C., Burke, C. J., Turner, L., Uong, A., Johnson, L. A., Beroukhim, R., Mermel, C. H., Loda, M., Ait-Si-Ali, S., ... Zon, L. I. (2011b). The histone methyltransferase SETDB1 is recurrently amplified in melanoma and accelerates its onset. *Nature*, *471*(7339), 513–518. <https://doi.org/10.1038/nature09806>
- Chait, B. T. (2006). Mass spectrometry: Bottom-up or top-down? *Science*, *314*(5796), 65–66. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1133987/ASSET/E04ACFC3-A074-4381-9FC0-A0B841C07D7D/ASSETS/SCIENCE.1133987.FP.PNG>
- Chang, C. Te, Hautbergue, G. M., Walsh, M. J., Viphakone, N., Van Dijk, T. B., Philipsen, S., & Wilson, S. A. (2013). Chtop is a component of the dynamic TREX mRNA export complex. *The EMBO Journal*, *32*(3), 473–486. <https://doi.org/10.1038/EMBOJ.2012.342>
- Cheeseman, I. M., Chappie, J. S., Wilson-Kubalek, E. M., & Desai, A. (2006). The conserved KMN network constitutes the core microtubule-binding site of the kinetochore. *Cell*, *127*(5), 983–997. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2006.09.039>
- Chen, R. H., Waters, J. C., Salmon, E. D., & Murray, A. W. (1996). Association of Spindle Assembly Checkpoint Component X MAD2 with Unattached Kinetochores. *Science*, *274*(5285), 242–246. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.274.5285.242>
- Cheng, L., Zhang, J., Ahmad, S., Rozier, L., Yu, H., Deng, H., & Mao, Y. (2011). Aurora B regulates formin mDia3 in achieving metaphase chromosome alignment. *Developmental Cell*, *20*(3), 342–352. <https://doi.org/10.1016/J.DEVCEL.2011.01.008>
- Cho, S., Park, J. S., & Kang, Y. K. (2013). Regulated nuclear entry of over-expressed Setdb1. *Genes to Cells*, *18*(8), 694–703. <https://doi.org/10.1111/gtc.12068>
- Cobbe, N., & Heck, M. M. S. (2000). Review: SMCs in the world of chromosome biology- from prokaryotes to higher eukaryotes. *Journal of Structural Biology*, *129*(2–3), 123–143. <https://doi.org/10.1006/JSBI.2000.4255>
- Cobbe, N., & Heck, M. M. S. (2004). The evolution of SMC proteins: phylogenetic analysis and structural implications. *Molecular Biology and Evolution*, *21*(2), 332–347. <https://doi.org/10.1093/MOLBEV/MSH023>
- Connell, C. M., Colnaghi, R., & Wheatley, S. P. (2008). Nuclear survivin has reduced stability and is not cytoprotective. *J. Biol. Chem.*, *283*(6), 3289–3296. <https://doi.org/10.1074/jbc.m704461200>
- Cooke, C. A., Heck, M. M. S., & Earnshaw, W. C. (1987). The inner centromere protein (INCENP) antigens: movement from inner centromere to midbody during mitosis. *J. Cell Biol.*, *105*(5), 2053–2067. <https://doi.org/10.1083/jcb.105.5.2053>

- Corces, V. G. (2014). *Architectural proteins : regulators of 3D genome organization in cell fate*. 24(11), 703–711. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2014.08.003>
- Courtheoux, T., Enchev, R. I., Lampert, F., Gerez, J., Beck, J., Picotti, P., Sumara, I., & Peter, M. (2016). Cortical dynamics during cell motility are regulated by CRL3KLHL21 E3 ubiquitin ligase. *Nature Communications* 2016 7:1, 7(1), 1–13. <https://doi.org/10.1038/ncomms12810>
- Cruz-Tapias, P., Zakharova, V., Perez-Fernandez, O. M., Mantilla, W., Ramírez-Clavijo, S., & Ait-Si-Ali, S. (2019a). Expression of the major and pro-oncogenic H3K9 lysine methyltransferase SETDB1 in non-small cell lung cancer. *Cancers*, 11(8), 1134. <https://doi.org/10.3390/cancers11081134>
- Cruz-Tapias, P., Zakharova, V., Perez-Fernandez, O., Mantilla, W., Ramírez-Clavijo, S., & Ait-Si-Ali, S. (2019b). Expression of the Major and Pro-Oncogenic H3K9 Lysine Methyltransferase SETDB1 in Non-Small Cell Lung Cancer. *Cancers*, 11(8), 1134. <https://doi.org/10.3390/cancers11081134>
- Cuellar, L., Herzner, A. M., Zhang, X., Goyal, Y., Watanabe, C., Friedman, B. A., Janakiraman, V., Durinck, S., Stinson, J., Arnott, D., Cheung, T. K., Chaudhuri, S., Modrusan, Z., Doerr, J. M., Classon, M., & Haley, B. (2017). Silencing of retrotransposons by SETDB1 inhibits the interferon response in acute myeloid leukemia. *Journal of Cell Biology*, 216(11), 3535–3549. <https://doi.org/10.1083/jcb.201612160>
- Czvitkovich, S., Sauer, S., Peters, A. H. F. M., Deiner, E., Wolf, A., Laible, G., Opravil, S., Beug, H., & Jenuwein, T. (2001). Over-expression of the SUV39H1 histone methyltransferase induces altered proliferation and differentiation in transgenic mice. *Mechanisms of Development*, 107(1–2), 141–153. [https://doi.org/10.1016/S0925-4773\(01\)00464-6](https://doi.org/10.1016/S0925-4773(01)00464-6)
- Da Fonseca, P. C. A., Kong, E. H., Zhang, Z., Schreiber, A., Williams, M. A., Morris, E. P., & Barford, D. (2010). Structures of APC/CCdh1 with substrates identify Cdh1 and Apc10 as the D-box co-receptor. *Nature* 2010 470:7333, 470(7333), 274–278. <https://doi.org/10.1038/nature09625>
- Dai, J., Sultan, S., Taylor, S. S., & Higgins, J. M. G. (2005). The kinase haspin is required for mitotic histone H3 Thr 3 phosphorylation and normal metaphase chromosome alignment. *Genes & Development*, 19(4), 472–488. <https://doi.org/10.1101/GAD.1267105>
- Deng, X., von Keudell, G., Suzuki, T., Dohmae, N., Nakakido, M., Piao, L., Yoshioka, Y., Nakamura, Y., & Hamamoto, R. (2015). PRMT1 promotes mitosis of cancer cells through arginine methylation of INCENP. *Oncotarget*, 6(34), 35173–35182. <https://doi.org/10.18632/ONCOTARGET.6050>
- Deniz, Ö., de la Rica, L., Cheng, K. C. L., Spensberger, D., & Branco, M. R. (2018). SETDB1 prevents TET2-dependent activation of IAP retroelements in naïve embryonic stem cells. *Genome Biology*, 19(1). <https://doi.org/10.1186/S13059-017-1376-Y>

- Dillon, S. C., Zhang, X., Trievel, R. C., & Cheng, X. (2005). *The SET-domain protein superfamily: protein lysine methyltransferases*. <https://doi.org/10.1186/gb-2005-6-8-227>
- Dodge, J. E., Kang, Y.-K., Beppu, H., Lei, H., & Li, E. (2004). Histone H3-K9 methyltransferase ESET is essential for early development. *Molecular and Cellular Biology*, 24(6), 2478–2486. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14993285>
- Douglas, M. E., Davies, T., Joseph, N., & Mishima, M. (2010). Aurora B and 14-3-3 coordinately regulate clustering of centralspindlin during cytokinesis. *Current Biology: CB*, 20(10), 927–933. <https://doi.org/10.1016/J.CUB.2010.03.055>
- Drechsel, E. (1889). Zur Kenntniss der Spaltungsprodukte des Caseïns. *Journal Für Praktische Chemie*, 39(1), 425–429. <https://doi.org/10.1002/PRAC.18890390135>
- Dürr, H., Flaus, A., Owen-Hughes, T., & Hopfner, K. P. (2006). Snf2 family ATPases and DExx box helicases: differences and unifying concepts from high-resolution crystal structures. *Nucleic Acids Research*, 34(15), 4160. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKL540>
- Eissenberg, J. C., & Shilatifard, A. (2010). Histone H3 lysine 4 (H3K4) methylation in development and differentiation. *Developmental Biology*, 339(2), 240–249. <https://doi.org/10.1016/J.YDBIO.2009.08.017>
- Elgin, S. C. R., & Reuter, G. (2013). Position-Effect Variegation, Heterochromatin Formation, and Gene Silencing in *Drosophila*. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 5(8). <https://doi.org/10.1101/CSHPERSPECT.A017780>
- Epsztejn-Litman, S., Feldman, N., Abu-Remaileh, M., Shufaro, Y., Gerson, A., Ueda, J., Deplus, R., Fuks, F., Shinkai, Y., Cedar, H., & Bergman, Y. (2008). De novo DNA methylation promoted by G9a prevents reprogramming of embryonically silenced genes. *Nature Structural & Molecular Biology* 2008 15:11, 15(11), 1176–1183. <https://doi.org/10.1038/nsmb.1476>
- Estève, P. O., Hang, G. C., Smallwood, A., Feehery, G. R., Gangisetty, O., Karpf, A. R., Carey, M. F., & Pradhan, S. (2006). Direct interaction between DNMT1 and G9a coordinates DNA and histone methylation during replication. *Genes & Development*, 20(22), 3089–3103. <https://doi.org/10.1101/GAD.1463706>
- Falnes, P., Jakobsson, M. E., Davydova, E., Ho, A., & Malecki, J. (2016). Protein lysine methylation by seven- β -strand methyltransferases. *The Biochemical Journal*, 473(14), 1995–2009. <https://doi.org/10.1042/BCJ20160117>
- Fei, Q., Shang, K., Zhang, J., Chuai, S., Kong, D., Zhou, T., Fu, S., Liang, Y., Li, C., Chen, Z., Zhao, Y., Yu, Z., Huang, Z., Hu, M., Ying, H., Chen, Z., Zhang, Y., Xing, F., Zhu, J., ... Shou, J. (2015). Histone methyltransferase SETDB1 regulates liver cancer cell growth through methylation of P53. *Nature Communications*, 6(1), 1–12. <https://doi.org/10.1038/ncomms9651>

- Fei, Q., Yang, X., Jiang, H., Wang, Q., Yu, Y., Yu, Y., Yi, W., Zhou, S., Chen, T., Lu, C., Atadja, P., Liu, X. S., Li, E., Zhang, Y., & Shou, J. (2015). SETDB1 modulates PRC2 activity at developmental genes independently of H3K9 trimethylation in mouse ES cells. *Genome Research*, 25(9), 1325–1335. <https://doi.org/10.1101/GR.177576.114>
- Feldman, N., Gerson, A., Fang, J., Li, E., Zhang, Y., Shinkai, Y., Cedar, H., & Bergman, Y. (2006). G9a-mediated irreversible epigenetic inactivation of Oct-3/4 during early embryogenesis. *Nature Cell Biology* 2006 8:2, 8(2), 188–194. <https://doi.org/10.1038/ncb1353>
- Feng, Q., Wang, H., Ng, H. H., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Struhl, K., & Zhang, Y. (2002). Methylation of H3-Lysine 79 Is Mediated by a New Family of HMTases without a SET Domain. *Current Biology*, 12(12), 1052–1058. [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(02\)00901-6](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(02)00901-6)
- Festenstein, R., Pagakis, S. N., Hiragami, K., Lyon, D., Verreault, A., Sekkali, B., & Kioussis, D. (2003). Modulation of heterochromatin protein 1 dynamics in primary Mammalian cells. *Science (New York, N.Y.)*, 299(5607), 719–721. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1078694>
- Fischle, W., Tseng, B. S., Dormann, H. L., Ueberheide, B. M., Garcia, B. A., Shabanowitz, J., Hunt, D. F., Funabiki, H., & Allis, C. D. (2005). Regulation of HP1 – chromatin binding by histone H3 methylation and phosphorylation. *Nature*, 438(December). <https://doi.org/10.1038/nature04219>
- Flemming, W. (1891). Attraktionssphären und Zentralkörperchen in Gewebs- und Wanderzellen. *Anat. Anz.*, 6, 78–86.
- Fritsch, L., Robin, P., Mathieu, J. R. R., Souidi, M., Hinaux, H., Rougeulle, C., Harel-Bellan, A., Ameyar-Zazoua, M., & Ait-Si-Ali, S. (2010). A Subset of the Histone H3 Lysine 9 Methyltransferases Suv39h1, G9a, GLP, and SETDB1 Participate in a Multimeric Complex. *Molecular Cell*, 37(1), 46–56. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2009.12.017>
- Gall, S. M. L., Bobé, P., Reiss, K., Horiuchi, K., Niu, X. Da, Lundell, D., Gibb, D. R., Conrad, D., Saftig, P., & Blobel, C. P. (2009). Nbl1p: a Borealin/Dasra/CSC-1-like protein essential for Aurora/Ipl1 complex function and integrity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Biol. Cell*, 20(6), 1772–1784. <https://doi.org/10.1091/mbc.e08-10-1011>
- Gassmann, R., Carvalho, A., Henzing, A. J., Ruchaud, S., Hudson, D. F., Honda, R., Nigg, E. A., Gerloff, D. L., & Earnshaw, W. C. (2004). Borealin: a novel chromosomal passenger required for stability of the bipolar mitotic spindle. *J. Cell Biol.*, 166(2), 179–191. <https://doi.org/10.1083/jcb.200404001>
- Gautier, J., Norbury, C., Lohka, M., Nurse, P., & Maller, J. (1988). Purified maturation-promoting factor contains the product of a *Xenopus* homolog of the fission yeast cell cycle control gene *cdc2+*. *Cell*, 54(3), 433–439. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(88\)90206-1](https://doi.org/10.1016/0092-8674(88)90206-1)

- Gehani, S. S., Agrawal-Singh, S., Dietrich, N., Christophersen, N. S., Helin, K., & Hansen, K. (2010). Polycomb Group Protein Displacement and Gene Activation through MSK-Dependent H3K27me3S28 Phosphorylation. *Molecular Cell*, 39(6), 886–900. <https://doi.org/10.1016/J.MOLCEL.2010.08.020>
- Gerlich, D., Hirota, T., Koch, B., Peters, J. M., & Ellenberg, J. (2006). Condensin I Stabilizes Chromosomes Mechanically through a Dynamic Interaction in Live Cells. *Current Biology*, 16(4), 333–344. <https://doi.org/10.1016/J.CUB.2005.12.040>
- Glover, D. M., Leibowitz, M. H., McLean, D. A., & Parry, H. (1995). Mutations in aurora prevent centrosome separation leading to the formation of monopolar spindles. *Cell*, 81(1), 95–105. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(95\)90374-7](https://doi.org/10.1016/0092-8674(95)90374-7)
- Goldknopf, R. L., Goldberg, I. L., Busch, D. A., Ballal, H., & Kang, N. R. (1975). Isolation and characterization of protein A24, a “histone-like” non-histone chromosomal protein. *Journal of Biological Chemistry*, 250(18), 7182–7187. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)40926-5](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)40926-5)
- Grana, X., & Reddy, E. P. (1995). *Cell cycle control in mammalian cells: Role of cyclins, cyclin dependent kinases (CDKs), growth suppressor genes and cyclin-dependent kinase inhibitors (CKIs)*. <https://www.researchgate.net/publication/15575285>
- Green, L. C., Kalitsis, P., Chang, T. M., Cipetic, M., Kim, J. H., Marshall, O., Turnbull, L., Whitchurch, C. B., Vagnarelli, P., Samejima, K., Earnshaw, W. C., Choo, K. H. A., & Hudson, D. F. (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.097790/258379/AM/CONTRASTING-ROLES-OF-CONDENSIN-I-AND-II-IN-MITOTIC>
- Greer, E. L., & Shi, Y. (2012). Histone methylation: A dynamic mark in health, disease and inheritance. In *Nature Reviews Genetics* (Vol. 13, Issue 5, pp. 343–357). <https://doi.org/10.1038/nrg3173>
- Grewal, S. I. S., & Elgin, S. C. R. (2002). Heterochromatin: new possibilities for the inheritance of structure. *Current Opinion in Genetics & Development*, 12(2), 178–187. [https://doi.org/10.1016/S0959-437X\(02\)00284-8](https://doi.org/10.1016/S0959-437X(02)00284-8)
- Grossman, S. R. (2001). p300/CBP/p53 interaction and regulation of the p53 response. *European Journal of Biochemistry*, 268(10), 2773–2778. <https://doi.org/10.1046/J.1432-1327.2001.02226.X>
- Grunstein, M. (1997). Histone acetylation in chromatin structure and transcription. *Nature* 1997 389:6649, 389(6649), 349–352. <https://doi.org/10.1038/38664>
- Guasconi, V., Pritchard, L. L., Fritsch, L., Mesner, L. D., Francastel, C., Harel-Bellan, A., & Ait-Si-Ali, S. (2010). Preferential association of irreversibly silenced E2F-target genes with pericentromeric heterochromatin in differentiated muscle cells. *Epigenetics*, 5(8), 704–709. <https://doi.org/10.4161/EPI.5.8.13025>

- Guo, J., Dai, X., Laurent, B., Zheng, N., Gan, W., Zhang, J., Guo, A., Yuan, M., Liu, P., Asara, J. M., Toker, A., Shi, Y., Pandolfi, P. P., & Wei, W. (2019). AKT methylation by SETDB1 promotes AKT kinase activity and oncogenic functions. *Nature Cell Biology*, *21*(2), 226–237. <https://doi.org/10.1038/s41556-018-0261-6>
- Guo, Y., Zhao, S., & Wang, G. G. (2021). Polycomb gene silencing mechanisms: PRC2 chromatin targeting, H3K27me3 “readout” and phase separation-based compaction HHS Public Access. *Trends Genet*, *37*(6), 547–565. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2020.12.006>
- Gyory, I., Wu, J., Fejér, G., Seto, E., & Wright, K. L. (2004). PRDI-BF1 recruits the histone H3 methyltransferase G9a in transcriptional silencing. *Nature Immunology* *2004* *5*:3, *5*(3), 299–308. <https://doi.org/10.1038/ni1046>
- Hames, R. S., Wattam, S. L., Yamano, H., Bacchieri, R., & Fry, A. M. (2001). APC/C-mediated destruction of the centrosomal kinase Nek2A occurs in early mitosis and depends upon a cyclin A-type D-box. *The EMBO Journal*, *20*(24), 7117–7127. <https://doi.org/10.1093/EMBOJ/20.24.7117>
- Heald, R., & McKeon, F. (1990). Mutations of phosphorylation sites in lamin A that prevent nuclear lamina disassembly in mitosis. *Cell*, *61*(4), 579–589. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(90\)90470-Y](https://doi.org/10.1016/0092-8674(90)90470-Y)
- Hempel, K., Lange, H. W., & Birkofer, L. (1968). ε-N-Trimethyllysin, eine neue Aminosäure in Histonen. *Naturwissenschaften* *1968* *55*:1, *55*(1), 37–37. <https://doi.org/10.1007/BF00593411>
- Henry, R. A., Kuo, Y. M., & Andrews, A. J. (2013). Differences in specificity and selectivity between CBP and p300 acetylation of histone H3 and H3/H4. *Biochemistry*, *52*(34), 5746–5759. https://doi.org/10.1021/BI400684Q/SUPPL_FILE/BI400684Q_SI_001.PDF
- Hindriksen, S., Meppelink, A., & Lens, S. M. A. (2015). Functionality of the chromosomal passenger complex in cancer. *Biochemical Society Transactions*, *43*(1), 23–32. <https://doi.org/10.1042/BST20140275>
- Hiragami, K., & Festenstein, R. (2005). Heterochromatin protein 1: a pervasive controlling influence. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS* *2005* *62*:23, *62*(23), 2711–2726. <https://doi.org/10.1007/S00018-005-5287-9>
- Hirano, T. (2012). Condensins: universal organizers of chromosomes with diverse functions. *Genes & Development*, 1659–1678. <https://doi.org/10.1101/gad.194746.112.GENES>
- Hirano, T. (2016). Condensin-Based Chromosome Organization from Bacteria to Vertebrates. *Cell*, *164*(5), 847–857. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2016.01.033>
- Hirano, T., & Mitchison, T. J. (1994). A heterodimeric coiled-coil protein required for mitotic chromosome condensation in vitro. *Cell*, *79*(3), 449–458. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(94\)90254-2](https://doi.org/10.1016/0092-8674(94)90254-2)

- Hirota, T., Gerlich, D., Koch, B., Ellenberg, J., & Peters, J. M. (2004). Distinct functions of condensin I and II in mitotic chromosome assembly. *Journal of Cell Science*, 117(26), 6435–6445. <https://doi.org/10.1242/JCS.01604>
- Hirota, T., Lipp, J. J., Toh, B. H., & Peters, J. M. (2005). Histone H3 serine 10 phosphorylation by Aurora B causes HP1 dissociation from heterochromatin. *Nature* 2005 438:7071, 438(7071), 1176–1180. <https://doi.org/10.1038/nature04254>
- Honda, R., Ko, R., Nigg, E. A., & Synchronization, C. (2003). *Exploring the Functional Interactions between Aurora B , INCENP , and Survivin in Mitosis*. 14(August), 3325–3341. <https://doi.org/10.1091/mbc.E02>
- Hsu, I. C., Metcalf, R. A., Sun, T., Welsh, J. A., Wang, N. J., & Harris, C. C. (1991). Mutational hotspot in the p53 gene in human hepatocellular carcinomas. *Nature*, 350(6317), 427–428. <https://doi.org/10.1038/350427A0>
- Huang, C., Chen, Y., Dai, H., Zhang, H., Xie, M., Zhang, H., Chen, F., Kang, X., Bai, X., & Chen, Z. (2019). UBAP2L arginine methylation by PRMT1 modulates stress granule assembly. *Cell Death & Differentiation* 2019 27:1, 27(1), 227–241. <https://doi.org/10.1038/s41418-019-0350-5>
- Huang, J., Dorsey, J., Chuikov, S., Zhang, X., Jenuwein, T., Reinberg, D., & Berger, S. L. (2010). G9a and Glp methylate lysine 373 in the tumor suppressor p53. *The Journal of Biological Chemistry*, 285(13), 9636–9641. <https://doi.org/10.1074/JBC.M109.062588>
- Huang, J., Perez-Burgos, L., Placek, B. J., Sengupta, R., Richter, M., Dorsey, J. A., Kubicek, S., Opravil, S., Jenuwein, T., & Berger, S. L. (2006). Repression of p53 activity by Smyd2-mediated methylation. *Nature*, 444(7119), 629–632. <https://doi.org/10.1038/NATURE05287>
- Huang, J., Sengupta, R., Espejo, A. B., Lee, M. G., Dorsey, J. A., Richter, M., Opravil, S., Shiekhatar, R., Bedford, M. T., Jenuwein, T., & Berger, S. L. (2007). p53 is regulated by the lysine demethylase LSD1. *Nature* 2007 449:7158, 449(7158), 105–108. <https://doi.org/10.1038/nature06092>
- Hümmer, S., & Mayer, T. U. (2009). Cdk1 negatively regulates midzone localization of the mitotic kinesin Mklp2 and the chromosomal passenger complex. *Current Biology : CB*, 19(7), 607–612. <https://doi.org/10.1016/J.CUB.2009.02.046>
- Hwang, Y. J., Han, D., Kim, K. Y., Min, S. J., Kowall, N. W., Yang, L., Lee, J., Kim, Y., & Ryu, H. (2014). ESET methylates UBF at K232/254 and regulates nucleolar heterochromatin plasticity and rDNA transcription. *Nucleic Acids Research*, 42(3), 1628. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKT1041>
- Hwang, Y. J., Hyeon, S. J., Kim, Y., Lim, S., Lee, M. Y., Kim, J., Londhe, A. M., Gotina, L., Kim, Y., Pae, A. N., Cho, Y. S., Seong, J., Seo, H., Kim, Y. K., Choo, H., Ryu, H., & Min, S. J. (2021). Modulation of SETDB1 activity by APQ ameliorates heterochromatin condensation, motor function, and neuropathology in a

- Huntington's disease mouse model. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 36(1), 856. <https://doi.org/10.1080/14756366.2021.1900160>
- Ikeda, F., & Dikic, I. (2008). Atypical ubiquitin chains: new molecular signals. *EMBO Reports*, 9(6), 536–542. <https://doi.org/10.1038/EMBOR.2008.93>
- Israels, E. D., & Israels, L. G. (2000). The Cell Cycle. *The Oncologist*, 5(6), 510–513. <https://doi.org/10.1634/THEONCOLOGIST.5-6-510>
- Jakobsson, M. E. (2021). Enzymology and significance of protein histidine methylation. *Journal of Biological Chemistry*, 297(4). <https://doi.org/10.1016/J.JBC.2021.101130>
- Jeffery, L., & Nakielnny, S. (2004). Components of the DNA methylation system of chromatin control are RNA-binding proteins. *The Journal of Biological Chemistry*, 279(47), 49479–49487. <https://doi.org/10.1074/JBC.M409070200>
- Jelluma, N., Brenkman, A. B., van den Broek, N. J. F., Cruijisen, C. W. A., van Osch, M. H. J., Lens, S. M. A., Medema, R. H., & Kops, G. J. P. L. (2008). Mps1 phosphorylates Borealin to control Aurora B activity and chromosome alignment. *Cell*, 132(2), 233–246. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.11.046>
- Jensen, O. N. (2004). Modification-specific proteomics: Characterization of post-translational modifications by mass spectrometry. *Current Opinion in Chemical Biology*, 8(1), 33–41. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2003.12.009>
- Jenuwein, T., & Allis, C. D. (2001). Translating the histone code. *Science*, 293(5532), 1074–1080. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1063127/ASSET/FCD15CEA-ECDC-41AF-AE32-FEDCEA8620CC/ASSETS/GRAPHIC/SE3119652003.JPEG>
- Jessberger, R. (2002). The many functions of smc proteins in chromosome dynamics. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2002 3:10, 3(10), 767–778. <https://doi.org/10.1038/nrm930>
- Jeyapakash, A. A., Basquin, C., Jayachandran, U., & Conti, E. (2011a). Structural basis for the recognition of phosphorylated histone h3 by the survivin subunit of the chromosomal passenger complex. *Structure (London, England: 1993)*, 19(11), 1625–1634. <https://doi.org/10.1016/J.STR.2011.09.002>
- Jeyapakash, A. A., Basquin, C., Jayachandran, U., & Conti, E. (2011b). Structural basis for the recognition of phosphorylated histone H3 by the survivin subunit of the chromosomal passenger complex. *Structure*, 19(11), 1625–1634. <https://doi.org/10.1016/j.str.2011.09.002>
- Jeyapakash, A. A., Klein, U. R., Lindner, D., Ebert, J., Nigg, E. A., & Conti, E. (2007). Structure of a Survivin–Borealin–INCENP core complex reveals how chromosomal passengers travel together. *Cell*, 131(2), 271–285. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.07.045>
- Jiang, Y., Loh, Y. E., Rajarajan, P., Hirayama, T., Liao, W., Kassim, B. S., Javidfar, B.,

- Hartley, B. J., Kleofas, L., Park, R. B., Labonte, B., Ho, S., Chandrasekaran, S., Do, C., Ramirez, B. R., Peter, C. J., Julia, T. C. W., Safaie, B. M., Morishita, H., ... Akbarian, S. (2017). The methyltransferase SETDB1 regulates a large neuron-specific topological chromatin domain. *Nature Publishing Group*, 49(8), 1239–1250. <https://doi.org/10.1038/ng.3906>
- Johnson, E. S. (2004). Protein modification by SUMO. *Annual Review of Biochemistry*, 73, 355–382. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV.BIOCHEM.73.011303.074118>
- Kang, J., Chaudhary, J., Dong, H., Kim, S., Brautigam, C. A., & Yua, H. (2011). Mitotic centromeric targeting of HP1 and its binding to Sgo1 are dispensable for sister-chromatid cohesion in human cells. *Mol. Biol. Cell*, 22(8), 1181–1190. <https://doi.org/10.1091/mbc.e11-01-0009>
- Katsuno, Y., Suzuki, A., Sugimura, K., Okumura, K., Zineldeen, D. H., Shimada, M., Niida, H., Mizuno, T., Hanaoka, F., & Nakanishi, M. (2009). Cyclin A-Cdk1 regulates the origin firing program in mammalian cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(9), 3184–3189. <https://doi.org/10.1073/PNAS.0809350106>
- Kearns, S., Mason, F. M., Rathmell, W. K., Park, I. Y., Walker, C., Verhey, K. J., & Cianfrocco, M. A. (2021). Molecular determinants for α -tubulin methylation by SETD2. *The Journal of Biological Chemistry*, 297(1). <https://doi.org/10.1016/J.JBC.2021.100898>
- Kelly, A. E., Ghenoiu, C., Xue, J. Z., Zierhut, C., Kimura, H., & Funabiki, H. (2010). Survivin reads phosphorylated histone H3 threonine 3 to activate the mitotic kinase Aurora B. *Science (New York, N.Y.)*, 330(6001), 235. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1189505>
- Kelly, A. E., Sampath, S. C., Maniar, T. A., Woo, E. M., Chait, B. T., & Funabiki, H. (2007). Chromosomal enrichment and activation of the Aurora B pathway are coupled to spatially regulate spindle assembly. *Dev. Cell*, 12(1), 31–43. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2006.11.001>
- Keppler, B. R., & Archer, T. K. (2008). Chromatin-modifying enzymes as therapeutic targets – Part 1. <http://Dx.Doi.Org/10.1517/14728222.12.10.1301>, 12(10), 1301–1312. <https://doi.org/10.1517/14728222.12.10.1301>
- Khleif, S. N., Degregori, J., Yee, C. L., Otterson, G. A., Kaye, F. J., Nevins, J. R., & Howley, P. M. (1996). Inhibition of cyclin D-CDK4/CDK6 activity is associated with an E2F-mediated induction of cyclin kinase inhibitor activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(9), 4350–4354. <https://doi.org/10.1073/PNAS.93.9.4350>
- Kim, J., Hake, S. B., & Roeder, R. G. (2005). The human homolog of yeast BRE1 functions as a transcriptional coactivator through direct activator interactions. *Molecular Cell*, 20(5), 759–770. <https://doi.org/10.1016/J.MOLCEL.2005.11.012>
- Kim, K. C., Geng, L., & Huang, S. (2003). Inactivation of a Histone Methyltransferase

- by Mutations in Human Cancers. *Cancer Research*, 63(22), 7619–7623. <http://aacrjournals.org/cancerres/article-pdf/63/22/7619/2509856/zch02203007619.pdf>
- Kim, S., & Paik, W. K. (1965). Studies on the Origin of ϵ -N-Methyl-L-lysine in Protein. *Journal of Biological Chemistry*, 240(12), 4629–4634. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)97001-8](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)97001-8)
- King, R. W., Jackson, P. K., & Kirschner, M. W. (1994). Mitosis in transition. *Cell*, 79(4), 563–571. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(94\)90542-8](https://doi.org/10.1016/0092-8674(94)90542-8)
- Knowlton, A. L., Lan, W., & Stukenberg, P. T. (2006). Aurora B Is Enriched at Merotelic Attachment Sites, Where It Regulates MCAK. *Current Biology*, 16(17), 1705–1710. <https://doi.org/10.1016/J.CUB.2006.07.057>
- Kontaki, H., & Talianidis, I. (2010). Lysine Methylation Regulates E2F1-Induced Cell Death. *Molecular Cell*, 39(1), 152–160. <https://doi.org/10.1016/J.MOLCEL.2010.06.006>
- Koprinarova, M., Schnekenburger, M., & Diederich, M. (2015). Role of Histone Acetylation in Cell Cycle Regulation. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 16(7), 732–744. <https://doi.org/10.2174/1568026615666150825140822>
- Kozar, K., & Sicinski, P. (2005). Cell Cycle Progression without Cyclin D-CDK4 and Cyclin D-CDK6 Complexes. <https://doi.org/10.4161/Cc.4.3.1551>, 4(3), 388–391. <https://doi.org/10.4161/CC.4.3.1551>
- Kuo, M. H., Zhou, J., Jambeck, P., Churchill, M. E. A., & Allis, C. D. (1998). Histone acetyltransferase activity of yeast Gcn5p is required for the activation of target genes in vivo. *Genes & Development*, 12(5), 627–639. <https://doi.org/10.1101/GAD.12.5.627>
- Kurasawa, Y., Earnshaw, W. C., Mochizuki, Y., Dohmae, N., & Todokoro, K. (2004). Essential roles of KIF4 and its binding partner PRC1 in organized central spindle midzone formation. *The EMBO Journal*, 23(16), 3237–3248. <https://doi.org/10.1038/SJ.EMBOJ.7600347>
- Kurash, J. K., Lei, H., Shen, Q., Marston, W. L., Granda, B. W., Fan, H., Wall, D., Li, E., & Gaudet, F. (2008). Methylation of p53 by Set7/9 Mediates p53 Acetylation and Activity In Vivo. *Molecular Cell*, 29(3), 392–400. <https://doi.org/10.1016/J.MOLCEL.2007.12.025>
- Lara-Gonzalez, P., Scott, M. I. F., Diez, M., Sen, O., & Taylor, S. S. (2011). BubR1 blocks substrate recruitment to the APC/C in a KEN-box-dependent manner. *Journal of Cell Science*, 124(24), 4332–4345. <https://doi.org/10.1242/JCS.094763>
- Lazaro-Camp, V. J., Salari, K., Meng, X., & Yang, S. (2021). Review Article SETDB1 in cancer: overexpression and its therapeutic implications. *Am J Cancer Res*, 11(5), 1803–1827. www.ajcr.us/

- Lee, J., Hwang, Y. J., Boo, J. H., Han, D., Kwon, O. K., Todorova, K., Kowall, N. W., Kim, Y., & Ryu, H. (2011). Dysregulation of upstream binding factor-1 acetylation at K352 is linked to impaired ribosomal DNA transcription in Huntington's disease. *Cell Death and Differentiation*, 18(11), 1726–1735. <https://doi.org/10.1038/CDD.2011.38>
- Lee, Junghee, Hwang, Y. J., Ryu, H., Kowall, N. W., & Ryu, H. (2014). Nucleolar dysfunction in Huntington's disease. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1842(6), 785–790. <https://doi.org/10.1016/J.BBADIS.2013.09.017>
- Lehnertz, B., Ueda, Y., Derijck, A. A. H. A., Braunschweig, U., Perez-Burgos, L., Kubicek, S., Chen, T., Li, E., Jenuwein, T., & Peters, A. H. F. M. (2003). Suv39h-mediated histone H3 lysine 9 methylation directs DNA methylation to major satellite repeats at pericentric heterochromatin. *Current Biology: CB*, 13(14), 1192–1200. [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(03\)00432-9](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(03)00432-9)
- Lens, S. M. A., Rodriguez, J. A., Vader, G., Span, S. W., Giaccone, G., & Medema, R. H. (2006). Uncoupling the central spindle-associated function of the chromosomal passenger complex from its role at centromeres. *Mol. Biol. Cell*, 17(4), 1897–1909. <https://doi.org/10.1091/mbc.e05-08-0727>
- Lens, S. M. A., Voest, E. E., & Medema, R. H. (2010). Shared and separate functions of polo-like kinases and aurora kinases in cancer. *Nature Rev. Cancer*, 10(12), 825–841. <https://doi.org/10.1038/nrc2964>
- Li, L. X., Zhou, J. X., Wang, X., Zhang, H., Harris, P. C., Calvet, J. P., & Li, X. (2020). Cross-talk between CDK4/6 and SMYD2 regulates gene transcription, tubulin methylation, and ciliogenesis. *Science Advances*, 6(44). <https://doi.org/10.1126/SCIADV.ABB3154>
- Ling, B. M. T., Bharathy, N., Chung, T. K., Kok, W. K., Li, S. De, Tan, Y. H., Rao, V. K., Gopinadhan, S., Sartorelli, V., Walsh, M. J., & Taneja, R. (2012). Lysine methyltransferase G9a methylates the transcription factor MyoD and regulates skeletal muscle differentiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(3), 841–846. <https://doi.org/10.1073/PNAS.1111628109>
- Lipp, J. J., Hirota, T., Poser, I., & Peter, J. M. (2007). Aurora B controls the association of condensin I but not condensin II with mitotic chromosomes. *Journal of Cell Science*, 120(Pt 7), 1245–1255. <https://doi.org/10.1242/JCS.03425>
- Listovsky, T., Zor, A., Laronne, A., & Brandeis, M. (2000). Cdk1 Is Essential for Mammalian Cyclosome/APC Regulation. *Experimental Cell Research*, 255(2), 184–191. <https://doi.org/10.1006/EXCR.1999.4788>
- Liu, N., Balliano, A., & Hayes, J. J. (2011). *Mechanism(s) of SWI/SNF-Induced Nucleosome Mobilization Strategies to regulate chromatin accessibility*. <https://doi.org/10.1002/cbic.201000455>
- Loyola, A., Tagami, H., Bonaldi, T., Roche, D., Quivy, J. P., Imhof, A., Nakatani, Y.,

- Dent, S. Y. R., & Almouzni, G. (2009). The HP1alpha-CAF1-SetDB1-containing complex provides H3K9me1 for Suv39-mediated K9me3 in pericentric heterochromatin. *EMBO Reports*, 10(7), 769–775. <https://doi.org/10.1038/embor.2009.90>
- Lynch, J. M., Maillet, M., Vanhoutte, D., Schloemer, A., Sargent, M. A., Blair, N. S., Lynch, K. A., Okada, T., Aronow, B. J., Osinska, H., Prywes, R., Lorenz, J. N., Mori, K., Lawler, J., Robbins, J., & Molkenin, J. D. (2012). A thrombospondin-dependent pathway for a protective ER stress response. *Cell*, 149(6), 1257–1268. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2012.03.050>
- Maerki, S., Olma, M. H., Staubli, T., Steigemann, P., Gerlich, D. W., Quadroni, M., Sumara, I., & Peter, M. (2009). The Cul3-KLHL21 E3 ubiquitin ligase targets Aurora B to midzone microtubules in anaphase and is required for cytokinesis. *Journal of Cell Biology*, 187(6), 791–800. <https://doi.org/10.1083/JCB.200906117/VIDEO-5>
- Maher, C. A., & Wilson, R. K. (2012). Chromothripsis and Human Disease: Piecing Together the Shattering Process. *Cell*, 148(0), 29. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2012.01.006>
- Malumbres, M. (2014). Cyclin-dependent kinases. *Genome Biology*, 15(6), 1–10. <https://doi.org/10.1186/GB4184/FIGURES/4>
- Martin, C., & Zhang, Y. (2005). The diverse functions of histone lysine methylation. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2005 6:11, 6(11), 838–849. <https://doi.org/10.1038/nrm1761>
- Matsui, S., Seon, B. K., & Sandberg, A. A. (1979). Disappearance of a structural chromatin protein A24 in mitosis: implications for molecular basis of chromatin condensation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 76(12), 6386–6390. <https://doi.org/10.1073/PNAS.76.12.6386>
- Matsui, T., Leung, D., Miyashita, H., Maksakova, I. A., Miyachi, H., Kimura, H., Tachibana, M., Lorincz, M. C., & Shinkai, Y. (2010). Proviral silencing in embryonic stem cells requires the histone methyltransferase ESET. *Nature*, 464(7290), 927–931. <https://doi.org/10.1038/nature08858>
- Matunis, M. J., Wu, J., & Blobel, G. (1998). SUMO-1 Modification and Its Role in Targeting the Ran GTPase-activating Protein, RanGAP1, to the Nuclear Pore Complex. *The Journal of Cell Biology*, 140(3), 499. <https://doi.org/10.1083/JCB.140.3.499>
- Mcvey, S. L., Cosby, J. K., & Nannas, N. J. (2021). *Molecular Sciences Aurora B Tension Sensing Mechanisms in the Kinetochores Ensure Accurate Chromosome Segregation*. <https://doi.org/10.3390/ijms22168818>
- Merkenschlager, M., & Nora, E. P. (2016). CTCF and Cohesin in Genome Folding and Transcriptional Gene Regulation. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*, 17, 17–43. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV-GENOM-083115->

- Messmer, S., Franke, A., & Paro, R. (1992). Analysis of the functional role of the Polycomb chromo domain in *Drosophila melanogaster*. *Genes & Development*, 6(7), 1241–1254. <https://doi.org/10.1101/GAD.6.7.1241>
- Mirchenko, L., & Uhlmann, F. (2010). Sli15(INCENP) dephosphorylation prevents mitotic checkpoint reengagement due to loss of tension at anaphase onset. *Curr. Biol.*, 20(15), 1396–1401. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2010.06.023>
- Moore, K. E., Carlson, S. M., Camp, N. D., Cheung, P., James, R. G., Chua, K. F., Wolf-Yadlin, A., & Gozani, O. (2013). A general molecular affinity strategy for global detection and proteomic analysis of lysine methylation. *Molecular Cell*, 50(3), 444–456. <https://doi.org/10.1016/J.MOLCEL.2013.03.005>
- Mosammamarast, N., & Shi, Y. (2010). Reversal of histone methylation: Biochemical and molecular mechanisms of histone demethylases. *Annual Review of Biochemistry*, 79, 155–179. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV.BIOCHEM.78.070907.103946>
- Mosavi, L. K., Cammett, T. J., Desrosiers, D. C., & Peng, Z. (2004). The ankyrin repeat as molecular architecture for protein recognition. *Protein Science*, 13(6), 1435–1448. <https://doi.org/10.1110/PS.03554604>
- Mozzetta, C., Boyarchuk, E., Pontis, J., & Ait-Si-Ali, S. (2015). Sound of silence: the properties and functions of repressive Lys methyltransferases. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 16(8), 499–513. <https://doi.org/10.1038/nrm4029>
- Murray, K. (1964). THE OCCURRENCE OF EPSILON-N-METHYL LYSINE IN HISTONES. *Biochemistry*, 3(1), 10–15. <https://doi.org/10.1021/BI00889A003>
- Nakagawa, T., Kajitani, T., Togo, S., Masuko, N., Ohdan, H., Hishikawa, Y., Koji, T., Matsuyama, T., Ikura, T., Muramatsu, M., & Ito, T. (2008). Deubiquitylation of histone H2A activates transcriptional initiation via trans-histone cross-talk with H3K4 di- and trimethylation. *Genes & Development*, 22(1), 37–49. <https://doi.org/10.1101/GAD.1609708>
- Nakajima, Y., Cormier, A., Tyers, R. G., Pigula, A., Peng, Y., Drubin, D. G., & Barnes, G. (2011). Ipl1/Aurora-dependent phosphorylation of Sli15/INCENP regulates CPC–spindle interaction to ensure proper microtubule dynamics. *J. Cell Biol.*, 194(1), 137–153. <https://doi.org/10.1083/jcb.201009137>
- Narasimha, A. M., Kaulich, M., Shapiro, G. S., Choi, Y. J., Sicinski, P., & Dowdy, S. F. (2014). Cyclin D activates the Rb tumor suppressor by mono-phosphorylation. *ELife*, 2014(3), 2872. <https://doi.org/10.7554/ELIFE.02872.001>
- Neurohr, G., Naegeli, A., Titos, I., Theler, D., Greber, B., Díez, J., Gabaldón, T., Mendoza, M., & Barral, Y. (2011). A midzone-based ruler adjusts chromosome compaction to anaphase spindle length. *Science*, 332(6028), 465–468. https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1201578/SUPPL_FILE/NEUROHR_SOM.PDF

- Nicklas, R. B., & Koch, C. A. (1969). Chromosome micromanipulation. 3. Spindle fiber tension and the reorientation of mal-oriented chromosomes. *The Journal of Cell Biology*, 43(1), 40–50. <https://doi.org/10.1083/JCB.43.1.40>
- Nielsen, P. R., Nietlispach, D., Mott, H. R., Callaghan, J., Bannister, A., Kouzarides, T., Murzin, A. G., Murzina, N. V., & Laue, E. D. (2002). Structure of the HP1 chromodomain bound to histone H3 methylated at lysine 9. *Nature* 2002 416:6876, 416(6876), 103–107. <https://doi.org/10.1038/nature722>
- Nigg, E. A. (2001). Mitotic kinases as regulators of cell division and its checkpoints. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2001 2:1, 2(1), 21–32. <https://doi.org/10.1038/35048096>
- Nozawa, R. S., Nagao, K., Masuda, H. T., Iwasaki, O., Hirota, T., Nozaki, N., Kimura, H., & Obuse, C. (2010). Human POGZ modulates dissociation of HP1 α from mitotic chromosome arms through Aurora B activation. *Nature Cell Biol.*, 12(7), 719–727. <https://doi.org/10.1038/ncb2075>
- Ntranos, A., & Casaccia, P. (2016). Bromodomains: translating the words of lysine acetylation into myelin injury and repair. *Neuroscience Letters*, 625, 4. <https://doi.org/10.1016/J.NEULET.2015.10.015>
- Ogawa, H., Ishiguro, K. I., Gaubatz, S., Livingston, D. M., & Nakatani, Y. (2002). A complex with chromatin modifiers that occupies E2f- and Myc-responsive genes in G0 cells. *Science*, 296(5570), 1132–1136. https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1069861/SUPPL_FILE/OGAWASUPPL.DOC
- Ogawa, S., Fukuda, A., Matsumoto, Y., Hanyu, Y., Sono, M., Fukunaga, Y., Masuda, T., Araki, O., Nagao, M., Yoshikawa, T., Goto, N., Hiramatsu, Y., Tsuda, M., Maruno, T., Nakanishi, Y., Hussein, M. S., Tsuruyama, T., Takaori, K., Uemoto, S., & Seno, H. (2020). SETDB1 Inhibits p53-Mediated Apoptosis and Is Required for Formation of Pancreatic Ductal Adenocarcinomas in Mice. *Gastroenterology*, 159(2), 682-696.e13. <https://doi.org/10.1053/J.GASTRO.2020.04.047>
- Olsen, C. A. (2012). Expansion of the Lysine Acylation Landscape. *Angewandte Chemie International Edition*, 51(16), 3755–3756. <https://doi.org/10.1002/ANIE.201200316>
- Olsen, J. B., Cao, X.-J., Han, B., Chen, L. H., Horvath, A., Richardson, T. I., Campbell, R. M., Garcia, B. A., & Nguyen, H. (2016). Quantitative Profiling of the Activity of Protein Lysine Methyltransferase SMYD2 Using SILAC-Based Proteomics* □ S. <https://doi.org/10.1074/mcp.M115.053280>
- Ono, T., Losada, A., Hirano, M., Myers, M. P., Neuwald, A. F., & Hirano, T. (2003). Differential contributions of condensin I and condensin II to mitotic chromosome architecture in vertebrate cells. *Cell*, 115(1), 109–121. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(03\)00724-4](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(03)00724-4)
- Paik, W. K., & Kim, S. (1967). E-N-dimethyllysine in histones. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 27(4), 479–483.

[https://doi.org/10.1016/S0006-291X\(67\)80010-X](https://doi.org/10.1016/S0006-291X(67)80010-X)

- Paik, W. K., & Kim, S. (1971). Protein methylation. *Science*, 174(4005), 114–119. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.174.4005.114/ASSET/39434D7E-1B84-4F77-A92E-837D97DD07B8/ASSETS/SCIENCE.174.4005.114.FP.PNG>
- Paik, W. K., & Kim, S. (1973). Enzymatic demethylation of calf thymus histones. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 51(3), 781–788. [https://doi.org/10.1016/0006-291X\(73\)91383-1](https://doi.org/10.1016/0006-291X(73)91383-1)
- Pasquarella, A., Ebert, A., de Almeida, G. P., Hinterberger, M., Kazerani, M., Nuber, A., Ellwart, J., Klein, L., Busslinger, M., & Schotta, G. (2016). Retrotransposon derepression leads to activation of the unfolded protein response and apoptosis in pro-B cells. *Development (Cambridge)*, 143(10), 1788–1799. <https://doi.org/10.1242/DEV.130203/-/DC1>
- Paweletz, N. (2001). Walther Flemming: pioneer of mitosis research. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2:1, 2(1), 72–75. <https://doi.org/10.1038/35048077>
- Pelletier, G., Stefanovsky, V. Y., Faubladiet, M., Hirschler-Laszkiwicz, I., Savard, J., Rothblum, L. I., Côté, J., & Moss, T. (2000). Competitive recruitment of CBP and Rb-HDAC regulates UBF acetylation and ribosomal transcription. *Molecular Cell*, 6(5), 1059–1066. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(00\)00104-0](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(00)00104-0)
- Pereira, G., & Schiebel, E. (2003). Separase regulates INCENP–Aurora B anaphase spindle function through Cdc14. *Science*, 302(5653), 2120–2124. <https://doi.org/10.1126/science.1091936>
- Peters, A. H. F. M., O'Carroll, D., Scherthan, H., Mechtler, K., Sauer, S., Schöfer, C., Weipoltshammer, K., Pagani, M., Lachner, M., Kohlmaier, A., Opravil, S., Doyle, M., Sibilia, M., & Jenuwein, T. (2001). Loss of the Suv39h histone methyltransferases impairs mammalian heterochromatin and genome stability. *Cell*, 107(3), 323–337. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(01\)00542-6](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(01)00542-6)
- Peters, J. M. (1998). SCF and APC: the Yin and Yang of cell cycle regulated proteolysis. *Current Opinion in Cell Biology*, 10(6), 759–768. [https://doi.org/10.1016/S0955-0674\(98\)80119-1](https://doi.org/10.1016/S0955-0674(98)80119-1)
- Petersen, B. O., Lukas, J., Sørensen, C. S., Bartek, J., & Helin, K. (1999). Phosphorylation of mammalian CDC6 by Cyclin A/CDK2 regulates its subcellular localization. *The EMBO Journal*, 18(2), 396–410. <https://doi.org/10.1093/EMBOJ/18.2.396>
- Petti, E., Jordi, F., Buemi, V., Dinami, R., Benetti, R., Blasco, M. A., & Schoeftner, S. (2015). Altered telomere homeostasis and resistance to skin carcinogenesis in suv39h1 transgenic mice. *Cell Cycle*, 14(9), 1438–1446. <https://doi.org/10.1080/15384101.2015.1021517>
- Picard, A., Labbe, J. C., & Doree, M. (1988). The cell cycle can occur in starfish oocytes and embryos without the production of transferable MPF (maturation-promoting

- factor). *Developmental Biology*, 128(1), 129–135. [https://doi.org/10.1016/0012-1606\(88\)90274-6](https://doi.org/10.1016/0012-1606(88)90274-6)
- Pickart, C. M. (1998). Polyubiquitin Chains. *Ubiquitin and the Biology of the Cell*, 19–63. https://doi.org/10.1007/978-1-4899-1922-9_2
- Pickart, C. M. (2004). Back to the future with ubiquitin. *Cell*, 116(2), 181–190. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(03\)01074-2](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(03)01074-2)
- Pinheiro, I., Margueron, R., Shukeir, N., Eisold, M., Fritsch, C., Richter, F. M., Mittler, G., Genoud, C., Goyama, S., Kurokawa, M., Son, J., Reinberg, D., Lachner, M., & Jenuwein, T. (2012). Prdm3 and Prdm16 are H3K9me1 Methyltransferases Required for Mammalian Heterochromatin Integrity. *Cell*, 150(5), 948–960. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2012.06.048>
- Ponting, C. P. (1997). Tudor domains in proteins that interact with RNA. *Trends in Biochemical Sciences*, 22(2), 51–52. [https://doi.org/10.1016/S0968-0004\(96\)30049-2](https://doi.org/10.1016/S0968-0004(96)30049-2)
- Potapova, T., & Gorbsky, G. J. (2017). The Consequences of Chromosome Segregation Errors in Mitosis and Meiosis. *Biology*, 6(1). <https://doi.org/10.3390/BIOLOGY6010012>
- Qi, M., Yu, W., Liu, S., Jia, H., Tang, L., Shen, M., Yan, X., Saiyin, H., Lang, Q., Wan, B., Zhao, S., & Yu, L. (2005). Septin1, a new interaction partner for human serine/threonine kinase aurora-B. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 336(3), 994–1000. <https://doi.org/10.1016/J.BBRC.2005.06.212>
- Rai, K., Nadauld, L. D., Chidester, S., Manos, E. J., James, S. R., Karpf, A. R., Cairns, B. R., & Jones, D. A. (2006). Zebra fish Dnmt1 and Suv39h1 regulate organ-specific terminal differentiation during development. *Molecular and Cellular Biology*, 26(19), 7077–7085. <https://doi.org/10.1128/MCB.00312-06>
- Rajan, P. K., Udoh, U. A., Sanabria, J. D., Banerjee, M., Smith, G., Schade, M. S., Sanabria, J., Sodhi, K., Pierre, S., Xie, Z., Shapiro, J. I., & Sanabria, J. (2020). The Role of Histone Acetylation-/Methylation-Mediated Apoptotic Gene Regulation in Hepatocellular Carcinoma. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(23), 1–21. <https://doi.org/10.3390/IJMS21238894>
- Rao, S. S. P., Huntley, M. H., Durand, N. C., Stamenova, E. K., Bochkov, I. D., Robinson, J. T., Sanborn, A. L., Machol, I., Omer, A. D., Lander, E. S., & Aiden, E. L. (2014). A 3D map of the human genome at kilobase resolution reveals principles of chromatin looping. *Cell*, 159(7), 1665–1680. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2014.11.021/ATTACHMENT/CB0E9D91-BC65-40C2-ACB4-623802E0869F/MMC3.XLSX>
- Rao, V. K., Pal, A., & Taneja, R. (2017). *A drive in SUVs: From development to disease*. <https://doi.org/10.1080/15592294.2017.1281502>

- Rapone, R., Del Maestro, L., Bouyioukos, C., Albini, S., Cruz-Tapias, P., Joliot, V., Cosson, B., & Ait-Si-Ali, S. (2022). *Essential Cytoplasmic Role of the Histone Lysine Methyltransferase Setdb1 in Post-Transcriptional Regulation in Embryonic Stem Cells*. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-145869/v1>
- Rea, S., Eisenhaber, F., O'Carroll, D., Strahl, B. D., Sun, Z. W., Schmid, M., Opravil, S., Mechtler, K., Ponting, C. P., Allis, C. D., & Jenuwein, T. (2000). Regulation of chromatin structure by site-specific histone H3 methyltransferases. *Nature* 2000 406:6796, 406(6796), 593–599. <https://doi.org/10.1038/35020506>
- Regina, C., Compagnone, M., Peschiaroli, A., Lena, A. M., Annicchiarico-Petruzzelli, M., Piro, M. C., Melino, G., & Candi, E. (2016). Setdb1, a novel interactor of ΔNp63, is involved in breast tumorigenesis. *Oncotarget*, 7(20), 28836–28848. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.7089>
- Reimann, M., Lee, S., Loddenkemper, C., Dörr, J. R., Tabor, V., Aichele, P., Stein, H., Dörken, B., Jenuwein, T., & Schmitt, C. A. (2010). Tumor stroma-derived TGF-beta limits myc-driven lymphomagenesis via Suv39h1-dependent senescence. *Cancer Cell*, 17(3), 262–272. <https://doi.org/10.1016/J.CCR.2009.12.043>
- Rice, R. H., Means, G. E., & Brown, W. D. (1977). Stabilization of bovine trypsin by reductive methylation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure*, 492(2), 316–321. [https://doi.org/10.1016/0005-2795\(77\)90082-4](https://doi.org/10.1016/0005-2795(77)90082-4)
- Rodriguez-Paredes, M., Martinez de Paz, A., Simó-Riudalbas, L., Sayols, S., Moutinho, C., Moran, S., Villanueva, A., Vázquez-Cedeira, M., Lazo, P. A., Carneiro, F., Moura, C. S., Vieira, J., Teixeira, M. R., & Esteller, M. (2014). Gene amplification of the histone methyltransferase SETDB1 contributes to human lung tumorigenesis. *Oncogene*, 33(21), 2807–2813. <https://doi.org/10.1038/onc.2013.239>
- Roopra, A., Qazi, R., Schoenike, B., Daley, T. J., & Morrison, J. F. (2004). Localized domains of G9a-mediated histone methylation are required for silencing of neuronal genes. *Molecular Cell*, 14(6), 727–738. <https://doi.org/10.1016/J.MOLCEL.2004.05.026/ATTACHMENT/C9E8FA63-E5C6-4E10-9AB1-EB73604FDF63/MMC1.PDF>
- Rosasco-Nitcher, S. E., Lan, W., Khorasanizadeh, S., & Stukenberg, P. T. (2008). Centromeric Aurora-B activation requires TD-60, microtubules, and substrate priming phosphorylation. *Science*, 319(5862), 469–472. <https://doi.org/10.1126/science.1148980>
- Ruchaud, S., Carmena, M., & Earnshaw, W. C. (2007). Chromosomal passengers: conducting cell division. *Nature Rev. Mol. Cell. Biol.*, 8(10), 798–812. <https://doi.org/10.1038/nrm2257>
- Sampath, S. C., Ohi, R., Leismann, O., Salic, A., Pozniakovski, A., & Funabiki, H. (2004). The chromosomal passenger complex is required for chromatin-induced microtubule stabilization and spindle assembly. *Cell*, 118(2), 187–202. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2004.06.026>

- Sawan, C., & Herceg, Z. (2010). Histone Modifications and Cancer. *Advances in Genetics*, 70(C), 57–85. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-380866-0.60003-4>
- Sawicka, A., & Seiser, C. (2012). Histone H3 phosphorylation – A versatile chromatin modification for different occasions. *Biochimie*, 94(11), 2193. <https://doi.org/10.1016/J.BIOCHI.2012.04.018>
- Schotta, G., Ebert, A., Krauss, V., Fischer, A., Hoffmann, J., Rea, S., Jenuwein, T., Dorn, R., & Reuter, G. (2002). Central role of Drosophila SU(VAR)3-9 in histone H3-K9 methylation and heterochromatic gene silencing. *The EMBO Journal*, 21(5), 1121–1131. <https://doi.org/10.1093/EMBOJ/21.5.1121>
- Schultz, D. C., Ayyanathan, K., Negorev, D., Maul, G. G., & Rauscher, F. J. (2002). SETDB1: A novel KAP-1-associated histone H3, lysine 9-specific methyltransferase that contributes to HP1-mediated silencing of euchromatic genes by KRAB zinc-finger proteins. *Genes and Development*, 16(8), 919–932. <https://doi.org/10.1101/gad.973302>
- Sessa, F., Mapelli, M., Ciferri, C., Tarricone, C., Areces, L. B., Schneider, T. R., Stukenberg, P. T., & Musacchio, A. (2005). Mechanism of Aurora B activation by INCENP and inhibition by hesperadin. *Mol. Cell*, 18(3), 379–391. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2005.03.031>
- Seto, E., & Yoshida, M. (2014). Erasers of Histone Acetylation: The Histone Deacetylase Enzymes. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 6(4). <https://doi.org/10.1101/CSHPERSPECT.A018713>
- Seum, C., Reo, E., Peng, H., Rauscher, F. J., Spierer, P., & Bontron, S. (2007). Drosophila SETDB1 Is Required for Chromosome 4 Silencing. *PLoS Genetics*, 3(5), 709–719. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PGEN.0030076>
- Shankar, S. R., Bahirvani, A. G., Rao, V. K., Bharathy, N., Ow, J. R., & Taneja, R. (2012). G9a, a multipotent regulator of gene expression. <http://Dx.Doi.Org/10.4161/Epi.23331>, 8(1), 16–22. <https://doi.org/10.4161/EPI.23331>
- Sheaff, R. J., Groudine, M., Gordon, M., Roberts, J. M., & Clurman, B. E. (1997). Cyclin E-CDK2 is a regulator of p27Kip1. *Genes & Development*, 11(11), 1464–1478. <https://doi.org/10.1101/GAD.11.11.1464>
- Shi, S. P., Qiu, J. D., Sun, X. Y., Suo, S. B., Huang, S. Y., & Liang, R. P. (2012). PLMLA: Prediction of lysine methylation and lysine acetylation by combining multiple features. *Molecular BioSystems*, 8(5), 1520–1527. <https://doi.org/10.1039/C2MB05502C>
- Shi, X., Kachirskaja, I., Yamaguchi, H., West, L. E., Wen, H., Wang, E. W., Dutta, S., Appella, E., & Gozani, O. (2007). Modulation of p53 function by SET8-mediated methylation at lysine 382. *Molecular Cell*, 27(4), 636. <https://doi.org/10.1016/J.MOLCEL.2007.07.012>

- Sims, R. J., Nishioka, K., & Reinberg, D. (2003). Histone lysine methylation: a signature for chromatin function. *Trends in Genetics*, 19(11), 629–639. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2003.09.007>
- Singh, P., Cho, J., Tsai, S. Y., Rivas, G. E., Larson, G. P., & Szabó, P. E. (2010). Coordinated allele-specific histone acetylation at the differentially methylated regions of imprinted genes. *Nucleic Acids Research*, 38(22), 7974–7990. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKQ680>
- Snowden, A. W., Gregory, P. D., Case, C. C., & Pabo, C. O. (2002). Gene-Specific Targeting of H3K9 Methylation Is Sufficient for Initiating Repression In Vivo. *Current Biology*, 12(24), 2159–2166. [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(02\)01391-X](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(02)01391-X)
- Song, Y. J., Choi, J. H., & Lee, H. (2015). Setdb1 is required for myogenic differentiation of C2C12 myoblast cells via maintenance of MyoD expression. *Molecules and Cells*, 38(4), 362–372. <https://doi.org/10.14348/MOLCELLS.2015.2291>
- Stabell, M., Eskeland, R., Bjørkmo, M., Larsson, J., Aalen, R. B., Imhof, A., & Lambertsson, A. (2006). The Drosophila G9a gene encodes a multi-catalytic histone methyltransferase required for normal development. *Nucleic Acids Research*, 34(16), 4609–4621. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKL640>
- Strepkos, D., Markouli, M., Klonou, A., Papavassiliou, A. G., & Piperi, C. (2021). Histone Methyltransferase SETDB1: A Common Denominator of Tumorigenesis with Therapeutic Potential. *Cancer Research*, 81(3), 525–534. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-20-2906/654631/AM/HISTONE-METHYLTRANSFERASE-SETDB1-A-COMMON>
- Sun, Y., Wei, M., Ren, S. C., Chen, R., Xu, W. D., Wang, F. B., Lu, J., Shen, J., Yu, Y. W., Hou, J. G., Xu, C. L., Huang, J. T., & Sun, Y. H. (2014). Histone methyltransferase SETDB1 is required for prostate cancer cell proliferation, migration and invasion. *Asian Journal of Andrology*, 16(2), 319. <https://doi.org/10.4103/1008-682X.122812>
- Szafer-Glusman, E., Fuller, M. T., & Giansanti, M. G. (2011). Role of Survivin in cytokinesis revealed by a separation-of-function allele. *Mol. Biol. Cell*, 22(20), 3779–3790. <https://doi.org/10.1091/mbc.e11-06-0569>
- Tachibana, M., Matsumura, Y., Fukuda, M., Kimura, H., & Shinkai, Y. (2008). G9a/GLP complexes independently mediate H3K9 and DNA methylation to silence transcription. *The EMBO Journal*, 27(20), 2681–2690. <https://doi.org/10.1038/EMBOJ.2008.192>
- Tachibana, M., Nozaki, M., Takeda, N., & Shinkai, Y. (2007). Functional dynamics of H3K9 methylation during meiotic prophase progression. *The EMBO Journal*, 26(14), 3346–3359. <https://doi.org/10.1038/SJ.EMBOJ.7601767>
- Tachibana, M., Ueda, J., Fukuda, M., Takeda, N., Ohta, T., Iwanari, H., Sakihama, T.,

- Kodama, T., Hamakubo, T., & Shinkai, Y. (2005). Histone methyltransferases G9a and GLP form heteromeric complexes and are both crucial for methylation of euchromatin at H3-K9. *Genes & Development*, *19*(7), 815–826. <https://doi.org/10.1101/GAD.1284005>
- Takada, I., Kouzmenko, A. P., & Kato, S. (2010). PPAR-gamma Signaling Crosstalk in Mesenchymal Stem Cells. *PPAR Research*, *2010*. <https://doi.org/10.1155/2010/341671>
- Takai, H., Masuda, K., Sato, T., Sakaguchi, Y., Suzuki, T., Suzuki, T., Koyama-Nasu, R., Nasu-Nishimura, Y., Katou, Y., Ogawa, H., Morishita, Y., Kozuka-Hata, H., Oyama, M., Todo, T., Ino, Y., Mukasa, A., Saito, N., Toyoshima, C., Shirahige, K., & Akiyama, T. (2014). 5-Hydroxymethylcytosine Plays a Critical Role in Glioblastomagenesis by Recruiting the CHTOP-Methylosome Complex. *Cell Reports*, *9*(1), 48–60. <https://doi.org/10.1016/J.CELREP.2014.08.071>
- Tan, M., Luo, H., Lee, S., Jin, F., Yang, J. S., Montellier, E., Buchou, T., Cheng, Z., Rousseaux, S., Rajagopal, N., Lu, Z., Ye, Z., Zhu, Q., Wysocka, J., Ye, Y., Khochbin, S., Ren, B., & Zhao, Y. (2011). Identification of 67 Histone Marks and Histone Lysine Crotonylation as a New Type of Histone Modification. *Cell*, *146*(6), 1016–1028. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2011.08.008>
- Terret, M. E., Wassmann, K., Waizenegger, I., Maro, B., Peters, J. M., & Verlhac, M. H. (2003). The Meiosis I-to-Meiosis II Transition in Mouse Oocytes Requires Separase Activity. *Current Biology*, *13*(20), 1797–1802. <https://doi.org/10.1016/J.CUB.2003.09.032>
- Thomä, N. H., Czyzewski, B. K., Alexeev, A. A., Mazin, A. V, Kowalczykowski, S. C., & Pavletich, N. P. (2005). Structure of the SWI2/SNF2 chromatin-remodeling domain of eukaryotic Rad54. *NATURE STRUCTURAL & MOLECULAR BIOLOGY*, *12*. <https://doi.org/10.1038/nsmb919>
- Thornton, B. R., Ng, T. M., Matyskiela, M. E., Carroll, C. W., Morgan, D. O., & Toczyski, D. P. (2006). An architectural map of the anaphase-promoting complex. *Genes & Development*, *20*(4), 449–460. <https://doi.org/10.1101/GAD.1396906>
- Thrower, J. S., Hoffman, L., Rechsteiner, M., & Pickart, C. M. (2000). Recognition of the polyubiquitin proteolytic signal. *The EMBO Journal*, *19*(1), 94–102. <https://doi.org/10.1093/EMBOJ/19.1.94>
- Torrano, J., Al Emran, A., Hammerlindl, H., & Schaidler, H. (2019). Emerging roles of H3K9me3, SETDB1 and SETDB2 in therapy-induced cellular reprogramming. In *Clinical Epigenetics* (Vol. 11, Issue 1). <https://doi.org/10.1186/s13148-019-0644-y>
- Trivedi, P., Zaytsev, A. V., Godzi, M., Ataulakhanov, F. I., Grishchuk, E. L., & Stukenberg, P. T. (2019). The binding of Borealin to microtubules underlies a tension independent kinetochore-microtubule error correction pathway. *Nature Communications* *2019 10:1*, *10*(1), 1–19. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-08418-4>

- Tsukahara, T., Tanno, Y., & Watanabe, Y. (2010). Phosphorylation of the CPC by Cdk1 promotes chromosome bi-orientation. *Nature* 2010 467:7316, 467(7316), 719–723. <https://doi.org/10.1038/nature09390>
- Uren, A. G., Beilharz, T., O'Connell, M. J., Bugg, S. J., Van Driel, R., Vaux, D. L., & Lithgow, T. (1999). Role for yeast inhibitor of apoptosis (IAP)-like proteins in cell division. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 96(18), 10170–10175. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.18.10170>
- Vakoc, C. R., Mandat, S. A., Olenchok, B. A., & Blobel, G. A. (2005). Histone H3 lysine 9 methylation and HP1gamma are associated with transcription elongation through mammalian chromatin. *Molecular Cell*, 19(3), 381–391. <https://doi.org/10.1016/J.MOLCEL.2005.06.011>
- Vakoc, C. R., Sachdeva, M. M., Wang, H., & Blobel, G. A. (2006). Profile of Histone Lysine Methylation across Transcribed Mammalian Chromatin. *Molecular and Cellular Biology*, 26(24), 9185. <https://doi.org/10.1128/MCB.01529-06>
- van der Waal, M. S., Hengeveld, R. C. C., van der Horst, A., & Lens, S. M. A. (2012). Cell division control by the chromosomal passenger complex. *Exp. Cell Res.*, 318(12), 1407–1420. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2012.03.015>
- Van Duyne, R., Easley, R., Wu, W., Berro, R., Pedati, C., Klase, Z., Kehn-Hall, K., Flynn, E. K., Symer, D. E., & Kashanchi, F. (2008). Lysine methylation of HIV-1 Tat regulates transcriptional activity of the viral LTR. *Retrovirology*, 5, 40. <https://doi.org/10.1186/1742-4690-5-40>
- Van Hooser, A., Goodrich, D. W., David Allis, C., Brinkley, B. R., & Mancini, M. A. (1998). Histone H3 phosphorylation is required for the initiation, but not maintenance, of mammalian chromosome condensation. *Journal of Cell Science*, 111(23), 3497–3506. <https://doi.org/10.1242/JCS.111.23.3497>
- Vázquez-Novelle, M. D., & Petronczki, M. (2010). Relocation of the chromosomal passenger complex prevents mitotic checkpoint engagement at anaphase. *Curr. Biol.*, 20(15), 1402–1407. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2010.06.036>
- Völkel, P., & Angrand, P. O. (2007). The control of histone lysine methylation in epigenetic regulation. *Biochimie*, 89(1), 1–20. <https://doi.org/10.1016/J.BIOCHI.2006.07.009>
- Vong, Q. P., Cao, K., Li, H. Y., Iglesias, P. A., & Zheng, Y. (2005). Chromosome alignment and segregation regulated by ubiquitination of survivin. *Science*, 310(5753), 1499–1504. <https://doi.org/10.1126/science.1120160>
- Waddington, C. H. H. (2011). The Epigenotype. [Article]. *International Journal of Epidemiology*, 41(1), 10–13. <https://doi.org/info:doi/>
- Wang, H., An, W., Cao, R., Xia, L., Erdjument-Bromage, H., Chatton, B., Tempst, P., Roeder, R. G., & Zhang, Y. (2003). mAM facilitates conversion by ESET of dimethyl to trimethyl lysine 9 of histone H3 to cause transcriptional repression.

- Molecular Cell*, 12(2), 475–487. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2003.08.007>
- Wang, H., Wang, L., Erdjument-Bromage, H., Vidal, M., Tempst, P., Jones, R. S., & Zhang, Y. (2004). Role of histone H2A ubiquitination in Polycomb silencing. *Nature*, 431(7010), 873–878. <https://doi.org/10.1038/NATURE02985>
- Welburn, J. P. I., Vleugel, M., Liu, D., Yates, J. R., Lampson, M. A., Fukagawa, T., & Cheeseman, I. M. (2010). Aurora B phosphorylates spatially distinct targets to differentially regulate the kinetochore–microtubule interface. *Mol. Cell*, 38(3), 383–392. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2010.02.034>
- West, M. H. P., & Bonner, W. M. (1980). Histone 2B can be modified by the attachment of ubiquitin. *Nucleic Acids Research*, 8(20), 4671–4680. <https://doi.org/10.1093/NAR/8.20.4671>
- Wilkinson, K. A., & Henley, J. M. (2010). Mechanisms, regulation and consequences of protein SUMOylation. *Biochemical Journal*, 428(2), 133–145. <https://doi.org/10.1042/BJ20100158>
- Wilkinson, K. D. (1995). Roles of ubiquitinylation in proteolysis and cellular regulation. *Annual Review of Nutrition*, 15, 161–189. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV.NU.15.070195.001113>
- Worden, E. J., & Wolberger, C. (2019). Activation and regulation of H2B-Ubiquitin-dependent histone methyltransferases. *Current Opinion in Structural Biology*. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2019.05.009>
- Wysocka, J. (2006). Identifying novel proteins recognizing histone modifications using peptide pull-down assay. *Methods (San Diego, Calif.)*, 40(4), 339. <https://doi.org/10.1016/J.YMETH.2006.05.028>
- Yahiro, K., Higashihori, N., & Moriyama, K. (2017). Histone methyltransferase Setdb1 is indispensable for Meckel's cartilage development. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 482(4), 883–888. <https://doi.org/10.1016/J.BBRC.2016.11.128>
- Yamagishi, Y., Honda, T., Tanno, Y., & Watanabe, Y. (2010). Two histone marks establish the inner centromere and chromosome bi-orientation. *Science*, 330(6001), 239–243. <https://doi.org/10.1126/science.1194498>
- Yamano, H., Gannon, J., Mahbubani, H., & Hunt, T. (2004). Cell Cycle-Regulated Recognition of the Destruction Box of Cyclin B by the APC/C in Xenopus Egg Extracts. *Molecular Cell*, 13(1), 137–147. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(03\)00480-5](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(03)00480-5)
- Yang, F., Camp, D. G., Gritsenko, M. A., Luo, Q., Kelly, R. T., Clauss, T. R. W., Brinkley, W. R., Smith, R. D., & Stenoien, D. L. (2007). Identification of a novel mitotic phosphorylation motif associated with protein localization to the mitotic apparatus. *Journal of Cell Science*, 120(Pt 22), 4060–4070. <https://doi.org/10.1242/JCS.014795>

- Yang, X. J. (2004). Lysine acetylation and the bromodomain: A new partnership for signaling. *BioEssays*, 26(10), 1076–1087. <https://doi.org/10.1002/BIES.20104>
- Yang, X., Yang, Y., Sun, B.-F., Chen, Y.-S., Xu, J.-W., Lai, W.-Y., Li, A., Wang, X., Bhattarai, D. P., Xiao, W., Sun, H.-Y., Zhu, Q., Ma, H.-L., Adhikari, S., Sun, M., Hao, Y.-J., Zhang, B., Huang, C.-M., Huang, N., ... Yang, Y.-G. (2017). 5-methylcytosine promotes mRNA export-NSUN2 as the methyltransferase and ALYREF as an m⁵C reader. *Cell Research*, 27, 606–625. <https://doi.org/10.1038/cr.2017.55>
- Yi, X., Jiang, X. J., & Fang, Z. M. (2019). Histone methyltransferase SMYD2: Ubiquitous regulator of disease. *Clinical Epigenetics*, 11(1), 1–11. <https://doi.org/10.1186/S13148-019-0711-4/FIGURES/4>
- Young, P., Deveraux, Q., Beal, R. E., Pickart, C. M., & Rechsteiner, M. (1998). Characterization of Two Polyubiquitin Binding Sites in the 26 S Protease Subunit 5a. *Journal of Biological Chemistry*, 273(10), 5461–5467. <https://doi.org/10.1074/JBC.273.10.5461>
- Zakharova, V. V., Magnitov, M. D., Del Maestro, L., Ulianov, S. V., Glentis, A., Uyanik, B., Williard, A., Karpukhina, A., Demidov, O., Joliot, V., Vassetzky, Y. S., Mège, R. D. S. M., Piel, M., Razin, S. V., & Ait-Si-Ali, S. (2022). SETDB1 fuels the lung cancer phenotype by modulating epigenome, 3D genome organization and chromatin mechanical properties. *Nucleic Acids Research*, 50(8), 4389. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKAC234>
- Zhang, X., Wen, H., & Shi, X. (2012). Lysine methylation: beyond histones. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 44(1), 14–27. <https://doi.org/10.1093/ABBS/GMR100>
- Zhang, Y., & Reinberg, D. (2001). Transcription regulation by histone methylation: interplay between different covalent modifications of the core histone tails. *Genes & Development*, 15(18), 2343–2360. <https://doi.org/10.1101/GAD.927301>
- Zhang, Yuqin, Huang, J., Li, Q., Chen, K., Liang, Y., Zhan, Z., Ye, F., Ni, W., Chen, L., & Ding, Y. (2018). Histone methyltransferase SETDB1 promotes cells proliferation and migration by interacting with Tiam1 in hepatocellular carcinoma. *BMC Cancer*, 18(1), 539. <https://doi.org/10.1186/s12885-018-4464-9>
- Zhu, B., Zheng, Y., Pham, A. D., Mandal, S. S., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., & Reinberg, D. (2005). Monoubiquitination of human histone H2B: the factors involved and their roles in HOX gene regulation. *Molecular Cell*, 20(4), 601–611. <https://doi.org/10.1016/J.MOLCEL.2005.09.025>
- Zhu, X., Ohtsubo, M., Böhmer, R. M., Roberts, J. M., & Assoian, R. K. (1996). Adhesion-dependent cell cycle progression linked to the expression of cyclin D1, activation of cyclin E-cdk2, and phosphorylation of the retinoblastoma protein. *Journal of Cell Biology*, 133(2), 391–403. <https://doi.org/10.1083/JCB.133.2.391>