

INRS-INSTITUT ARMAND-FRAPPIER

**PHOSPHORYLATION DE LA MÉTHYLTRANSFÉRASE DE L'ADN 1 PAR LES  
PROTÉINES SÉRINE/THRÉONINE KINASES**

PAR  
**GENEVIÈVE LAVOIE**

THÈSE PRÉSENTÉE  
POUR L'OBTENTION DU GRADE DE  
**PHILOSOPHIAE DOCTOR (PH.D.)**  
EN VIROLOGIE ET IMMUNOLOGIE

**JURY D'ÉVALUATION**

DIRECTEUR DE RECHERCHE

Dr. YVES ST-PIERRE  
INRS-INSTITUT ARMAND FRAPPIER

PRÉSIDENT DU JURY ET  
EXAMINATEUR INTERNE

Dr. CHARLES RAMASSAMY  
INRS-INSTITUT ARMAND-FRAPPIER

EXAMINATEURS EXTERNES

Dr. NATHALIE BÉRUBÉ  
CHILDREN'S HEALTH RESEARCH INSTITUTE

Dr. FRANÇOIS DRAGON  
UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL



## REMERCIEMENTS

Je remercie mon directeur de recherche, le Dr. Yves St-Pierre, qui a su diriger mon projet avec brio. Dès mon début à la maîtrise, Yves, tu m'as fait confiance, en m'offrant un projet unique et me laissant par la suite, lors de mon doctorat, une grande latitude. J'ai beaucoup apprécié ton accessibilité et ton support, de même que nos discussions scientifiques ou non et ta grande générosité! Je te suis extrêmement reconnaissante de tout ce que tu m'as appris ainsi que pour la scientifique que je suis devenue. Je tiens également à souligner ton ouverture d'esprit et ta compréhension, qui ont rendu ces années passées dans ton labo encore plus mémorables. Merci Yves!

Je remercie également tous les membres passés et présents du laboratoire pour vos bons conseils et avis scientifiques, mais également pour nos discussions et nos délires! Merci particulièrement à mes trois comparses, Julie, Carole et Katherine, avec qui j'ai évolué tout au long de ma maîtrise-doctorat et avec qui j'ai vécu de très bons moments. Enfin, je remercie également les « Mamans » du labo, Carole, Katherine et Andrée-Anne, pour nos nombreuses discussions et pour le partage de votre expérience.

Un merci tout spécial à Diane et Doris pour votre support et votre aide, mais aussi pour votre écoute et pour votre générosité. J'ai vraiment apprécié travailler avec vous!

Merci également au Dr. Sriharsa Pradhan et au Dr. Pierre-Olivier Estève, nos collaborateurs du New England Biolabs. Vous m'avez bien accueilli lors de mon stage dans votre laboratoire. Merci pour les bonnes discussions et pour avoir partagé votre savoir sur l'épigénétique.

Merci à l'INRS-Institut Armand-Frappier pour son support, et merci à sa communauté pour le partage de sa culture scientifique. Merci également aux différents organismes pour leur soutien financier, soient le Conseil de recherches en sciences naturelles et en génie du Canada, la Fondation Armand-Frappier, les Fonds de la recherche en santé du Québec et les Instituts de recherche en santé du Canada.

Finalement, un gros merci à mes amis et à ma précieuse famille qui ont toujours été présents pour moi et qui m'ont encouragé tout au long de mes études. Merci spécialement à mon conjoint, Jean-François, pour son soutien dans les moments difficiles ou non, son écoute et son amour. Merci d'être là pour moi et nos enfants.

*Dear Madam et Monsieur,*

## TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS.....	iii
TABLE DES MATIÈRES .....	v
LISTE DES FIGURES.....	vii
LISTE DES TABLEAUX .....	ix
LISTE DES ANNEXES .....	x
LISTE DES ABRÉVIATIONS .....	xi
RÉSUMÉ GÉNÉRAL .....	xiii

### CHAPITRE I

#### Revue de littérature

<b>1. L'épigénétique .....</b>	<b>2</b>
1.1 Introduction.....	2
1.2 La chromatine .....	2
1.2.1 Euchromatine et hétérochromatine .....	3
1.3 Modifications des histones.....	5
1.4 Méthylation de l'ADN .....	8
1.4.1 Introduction.....	8
1.4.2 Les îlots CpG .....	9
1.4.3 Les méthyltransférases de l'ADN.....	9
1.4.4 Rôles de la méthylation de l'ADN.....	12
1.4.5 Maladies génétiques.....	16
1.4.6 Cancers .....	16
<b>2. La méthyltransférase de l'ADN 1 .....</b>	<b>23</b>
2.1 Introduction.....	23
2.2 Rôles .....	23
2.3 Régulation.....	35
2.3.1 Régulation allostérique .....	26
2.3.2 Régulation transcriptionnelle et post-transcriptionnelle .....	27
2.3.3 Interactions protéine-protéine.....	29
2.3.4 Modifications post-traductionnelles .....	32
2.4 La phosphorylation de DNMT1 par les protéines sérine/thréonine kinases .....	34
<b>3. Les protéines kinases.....</b>	<b>36</b>
3.1 Introduction.....	36
3.2 Les protéines sérine/thréonine kinases .....	37
3.3 La famille des protéines kinases C .....	39

3.3.1 Classification, structure et activation.....	39	
3.3.2 Fonctions.....	42	
3.3.3 La PKC $\zeta$ .....	43	
3.3.4 PKC et cancers.....	46	
3.4 La famille des protéines kinases dépendantes des cyclines .....	48	
3.4.1 Les isoformes de CDK.....	48	
3.4.2 Régulation de la progression du cycle cellulaire .....	49	
3.4.3 Rôles biologiques des autres CDK .....	51	
3.4.4 Les CDK comme cibles thérapeutiques dans le cancer .....	53	
<b>4. Les objectifs généraux de la thèse et modèle d'étude.....</b>	<b>54</b>	
<b>CHAPITRE II</b>		
<b>PKC isoforms interact with and phosphorylate DNMT1</b>		
<b>CONTRIBUTION DES AUTEURS .....</b>	<b>58</b>	
<b>RÉSUMÉ.....</b>	<b>59</b>	
<b>CHAPITRE III</b>		
<b>Phosphorylation of human DNMT1: Implication of cyclin-dependent kinases</b>		
<b>CONTRIBUTION DES AUTEURS .....</b>	<b>95</b>	
<b>RÉSUMÉ.....</b>	<b>96</b>	
<b>CHAPITRE IV</b>		
<b>DISCUSSION GÉNÉRALE ET CONCLUSION.....</b>		<b>115</b>
<b>RÉFÉRENCES .....</b>	<b>134</b>	
<b>ANNEXES.....</b>	<b>176</b>	
<b>LISTE DES PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS .....</b>	<b>229</b>	

## **LISTE DES FIGURES**

### **CHAPITRE I**

- Figure 1. Organisation de la chromatine.
- Figure 2. Modifications d'histones.
- Figure 3. Mécanisme de la méthylation de cytosine dans le génome des mammifères.
- Figure 4. Organisation des domaines des DNMT.
- Figure 5. Mécanismes épigénétiques de l'inhibition de la transcription des gènes.
- Figure 6. Vue d'ensemble d'un complexe entre la mDNMT1(650-1602) et un oligomère d'ADN de 19 nucléotides lié à l'AdoHcy.
- Figure 7. Régulation post-traductionnelle de DNMT1.
- Figure 8. Schématisation des sites de phosphorylation de la DNMT1 humaine identifiés dans la littérature.
- Figure 9. Structure des domaines des isoformes de protéines kinases C (PKC).
- Figure 10. Les CDK et le cycle cellulaire.
- Figure 11. Modèle d'étude pour la phosphorylation de la DNMT1 humaine par les protéines sréine/thréonine kinases.

### **CHAPITRE II**

- Figure 1. PKC isoforms phosphorylate human recombinant DNMT1.
- Figure 2. PKC isoforms preferentially phosphorylate DNMT1 N-terminal domain.
- Figure 3. PKC $\epsilon$  does not phosphorylate individual domains of DNMT1.
- Figure 4. PKC $\zeta$  interacts with and phosphorylates DNMT1 fragments.
- Figure 5. DNMT1 and PKC $\zeta$  colocalize in the nucleus of HeLa cells.
- Figure 6. *In vivo* association between DNMT1 and PKC $\zeta$ .
- Figure 7. Decrease of DNA methylation in HEK-293 cells overexpressing DNMT1 and PKC $\zeta$ .
- Figure 8. Phosphorylation of DNMT1 by PKC $\zeta$  reduces its methyltransferase activity.

### **CHAPITRE III**

- Figure 1. DNMT1 Ser154 is phosphorylated by CDKs *in vitro*.
- Figure 2. Phosphorylation of Ser154 in HEK-293 cells.
- Figure 3. Functional interaction between DNMT1 and CDK5 in HEK-293 cells.

**Figure 4. Role of Ser154 on DNA methyltransferase activity and protein stability.**

## **CHAPITRE IV**

**Figure 1.** Représentation schématique des différentes régions correspondantes aux fragments de DNMT1 fusionnés à la GST.

**Figure 2.** Modèle hypothétique de la phosphorylation de DNMT1 par PKC $\zeta$  affectant la liaison de UHRF1.

**Figure 3.** Effets possibles de la phosphorylation de la Ser154 de DNMT1 par les CDK sur son interaction avec d'autres protéines et sa stabilité.

**Figure 4.** Modèle général pour la phosphorylation de DNMT1 par les PKC et les CDK et son rôle possible dans l'initiation du cancer.

## **LISTE DES TABLEAUX**

### **CHAPITRE I**

- Tableau I. Liste des principales enzymes responsables de la modification des histones.
- Tableau II. Descriptions et fonctions des méthyltransférases de l'ADN.
- Tableau III. Exemples de gènes hyperméthylés dans les cancers.
- Tableau IV. Résumé des protéines interagissant physiquement ou fonctionnellement avec DNMT1.
- Tableau V. Protéines sérine/thréonine kinases et leurs fonctions générales.
- Tableau VI. Sites de phosphorylation théoriques de la protéine DNMT1 humaine. Les sites ont été identifiés à partir de Scansite, Networkin et Phosida (UniProt ID: P26358).
- Tableau VII. Fonctions et expression des différents isoformes de PKC.

### **CHAPITRE II**

- Tableau I. List of identified genes selected among active regions.

### **CHAPITRE III**

- Tableau I. List of predicted phosphorylation sites and kinase candidates.

## **LISTE DES ANNEXES**

Annexe 1. PKC isoforms interact with and phosphorylate DNMT1.

Annexe 2. Phosphorylation of human DNMT1: Implication of cyclin-dependent kinases.

Annexe 3. Analyse des bandes contaminées retrouvées dans l'échantillon du fragment protéique de GST-DNMT1 1-446.

Annexe 4. Phosphorylation du domaine C-terminal de la DNMT1 par divers isoformes de PKC.

Annexe 5. La surexpression de DNMT1 et PKC $\zeta$  ne semble pas affecter l'expression de plusieurs gènes des familles de Galectines (Gal) et de Métalloprotéases de la matrice (MMP).

Annexe 6. La surexpression de PKC $\zeta$  et/ou de DNMT1 ne semble pas affecter l'expression des gènes *Egr1*, *Timp-3* et *Mmp-9*.

Annexe 7. L'interaction entre DNMT1 et PCNA n'est pas affectée par la phosphorylation de DNMT1 par PKC $\zeta$ .

Annexe 8. Analyse ICM de la formation de complexes par DNMT1.

Annexe 9. Quantifications relatives.

Annexe 10. Phosphorylation des fragments GST-DNMT1 par diverses sérine/thréonine kinases.

Annexe 11. Potential directions for drug development against galectin-7 in cancer.

Annexe 12. The role of DNA hypomethylation in the control of stromelysin gene expression.

## LISTE DES ABRÉVIATIONS

5-aza-dC	5-aza-2'-deoxycytidine
ADN	Acide déoxyribonucléique
ADP	Adénosine diphosphate
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	Acide ribonucléique messager
ARNt	Acide ribonucléique de transfert
ATP	Adénosine triphosphate
Bcl-2	B-cell lymphoma-2
BCR	B cell receptor
BRCA1	Breast cancer 1
CaMK	Ca <sup>2+</sup> /calmodulin-dependent protein kinase
CDK	Cyclin-dependent kinase
CDKL	CDK-like
ChIP-on-Chip	Immunoprécipitation de la chromatine suivie d'hybridation sur une matrice d'ADN
CK1	Casein kinase 1
CKI	CDK inhibitor
CKII	Casein kinase II
CpG	Cytosine-phosphate-guanine
CREB	cAMP response element-binding
Cyc	Cycline
DAG	Diacylglycérol
DMAP1	DNMT1-associated protein 1
ERK	Extracellular signal-regulated kinases
GSK-3	Glycogen synthase kinase-3
GST	Glutathione S-transferase
HAUSP	Herpes virus-associated ubiquitin specific protease
kDa	kilodalton
HDAC	Histone deacetylase
HP1	Heterochromatin protein 1
KRAS	Kirsten rat sarcoma
LINE	Long interspersed nuclear element
MAPK	Mitogen-activated protein kinases
MBD	Methyl-binding domain
MBP	Methyl-binding protein
mCpG	CpG méthylé
MeCP1/2	Methyl CpG binding protein 1/2
miARN	microARN
NF-κB	Nuclear factor-kappa B
NGF	Nerve growth factor
NLS	Nuclear localization signal
PAR-4	Prostate apoptosis response-4
PAR-6	Partitioning defective-6
PARP	Poly(ADP-ribose) polymerase

PB1	Phox and Bem1
PcG	Polycomb group
PCNA	Proliferating cell nuclear antigen
PDK1	3-phosphoinositide-dependent kinase 1
PIP <sub>3</sub>	Phosphatidylinositol 4,5-triphosphate
PKA	Protein kinase A
PKB/Akt	Protein kinase B/Akt
PKC	Protein kinase C
PKD	Protein kinase D
PMA	Phorbol 12-myristate 13-acéate
PP	Histone phosphatise
RAS	Rat sarcoma
RASSF1A	RAS association domain family 1A
Sp1	Specificity protein 1
S/T	Sérine/Thréonine
STAT3	Signal transducer and activator of transcription 3
SUMO	Small ubiquitin-like modifier
SUV39H1	Su(var)3-9 homolog 1
Tip60	HIV-Tat interacting protein
TNF- $\alpha$	Tumor necrosis factor $\alpha$
UHRF1	Ubiquitin-like with PHD and ring-finger domains 1

## RÉSUMÉ GÉNÉRAL

La méthylation de l'ADN joue un rôle central dans la régulation épigénétique de l'expression des gènes durant le développement et la progression de maladies, comme le cancer. Les patrons de méthylation sont acquis très tôt dans l'embryogenèse et sont maintenus lors de la réPLICATION cellulaire par la méthyltransférase de l'ADN 1 (DNMT1). DNMT1 est la méthyltransférase de l'ADN la plus abondante dans les cellules somatiques et sa régulation est complexe et encore peu comprise. Plusieurs études ont démontré que la forme humaine de DNMT1 était phosphorylée sur plusieurs résidus séries et thréonines dans différents types cellulaires et conditions physiologiques. Jusqu'à maintenant, l'identification des kinases responsables de cette phosphorylation ainsi que son importance fonctionnelle demeurent peu étudiées. La phosphorylation est l'une des modifications post-traductionnelles majeures et peut avoir divers effets sur les protéines ciblées, telle que la modulation de l'activité enzymatique et des interactions protéiques. Les travaux de recherche présentés dans cette thèse avaient pour objectif d'identifier les protéines série/thréonine kinases responsables de la phosphorylation de la DNMT1 et de déterminer les effets de cette phosphorylation sur les fonctions de l'enzyme.

Nous avons identifié deux familles de protéines série/thréonine kinases capables de phosphoryler la DNMT1, soient les protéines kinases C (PKC) et les protéines kinases dépendantes des cyclines (CDK). Dans un premier temps, nos résultats ont démontré que la phosphorylation de la DNMT1 humaine par les PKC est spécifique à certains isoformes et cible principalement le domaine N-terminal. L'utilisation de la PKC $\zeta$  comme modèle a permis de mettre en évidence l'interaction et la colocalisation entre celle-ci et DNMT1 dans le noyau cellulaire. Nous avons également observé une réduction dans le statut de méthylation des gènes à travers le génome lorsque PKC $\zeta$  et DNMT1 étaient surexprimées dans les cellules HEK-293. Ceci est cohérent avec nos résultats démontrant une réduction de l'activité de DNMT1 suite à sa phosphorylation par PKC $\zeta$ .

Dans un second temps, nous avons identifié la Ser154 de la DNMT1 humaine comme un site de phosphorylation ciblé par les CDK. Avec l'aide d'un inhibiteur spécifique de CDK1, 2 et 5, la roscovitine, nous avons démontré la phosphorylation de la DNMT1 endogène sur le résidu Ser154 dans les cellules HEK-293. Afin d'étudier l'importance de la phosphorylation de la Ser154 sur la fonctionnalité de l'enzyme, nous avons muté cette série en alanine (S154A). La

mutation S154A abolit presque complètement l'activité méthyltransférase de DNMT1, ce qui suggère que ce résidu est important pour son activité enzymatique. De plus, nous avons observé que ce mutant de DNMT1 était moins stable que la protéine de type sauvage à la suite d'un traitement avec le 5-aza-dC, un agent déméthylant reconnu pour induire la dégradation de DNMT1 via la voie de l'ubiquitine/protéasome.

L'ensemble de nos résultats identifie pour la première fois des isoformes de PKC ainsi que les CDK comme des kinases capables de phosphoryler DNMT1. Nos résultats démontrent également l'importance de cette phosphorylation sur l'activité et/ou la stabilité de l'enzyme, se traduisant par une hypométhylation globale du génome dans le cas des PKC, et un rôle potentiel dans l'activation ou le maintien de l'activité de DNMT1 pour les CDK. Considérant le fait que les PKC et les CDK sont impliqués dans le développement de plusieurs cancers, nous proposons que la dérégulation des PKC ou CDK pourrait induire une phosphorylation anormale de DNMT1 et ainsi mener à l'hypométhylation ou l'hyperméthylation du génome, des phénomènes fréquemment observés dans les cellules cancéreuses.

## **CHAPITRE I**

**Revue de littérature**

## 1. L'épigénétique

### 1.1 Introduction

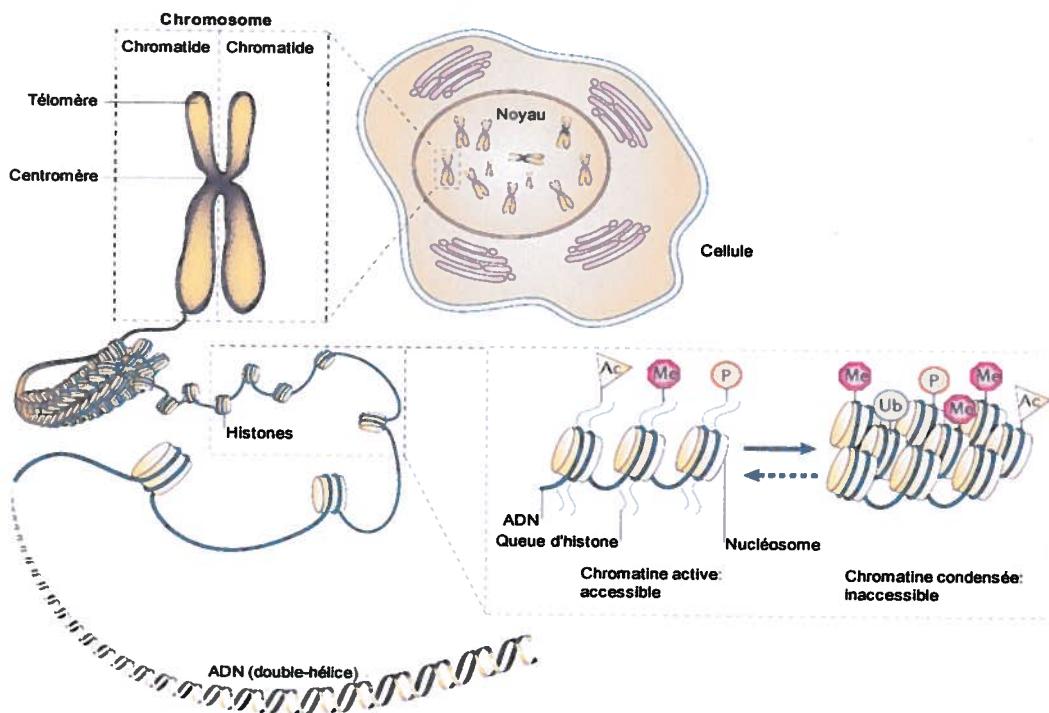
Chez les mammifères, le génome encode une grande quantité de gènes dans environ 200 types cellulaires différents, à de nombreux stades du développement, rendant nécessaire l'existence d'une programmation des patrons d'expression. Il est maintenant évident que de l'information additionnelle, requise pour une expression convenable des gènes, est encodée dans la séquence génomique et surpassé l'information donnée par les quatre bases de l'ADN [1]. Chez un organisme multicellulaire, les altérations phénotypiques qui se produisent de cellules en cellules durant le développement ont été décrites comme étant « l'architecture épigénétique ou épigénome » [2]. Jusqu'ici, le spectre cellulaire, des cellules souches aux cellules complètement différencierées, comporte une séquence d'ADN identique mais diffère de façon marquée dans le profil d'expression des gènes. Il est proposé que cette variation programmée constitue un « code génétique » qui agrandi significativement le potentiel de l'information du génome [3-5]. Dans plusieurs cas, les patrons épigénétiques semblent être hérités à travers les divisions cellulaires, assurant une mémoire qui pourrait permettre la transmission de l'information de ce code [6].

L'épigénétique a d'abord été définie comme étant l'ensemble des modifications transmissibles et réversibles de l'expression des gènes qui n'implique aucune altération dans la séquence nucléotidique de l'ADN. Durant la dernière décennie, des données considérables ont été accumulées sur les familles d'enzymes de modification de la chromatine et de méthylation de l'ADN. En des termes plus modernes, l'épigénétique peut maintenant être définie comme étant la somme des altérations de la chromatine (modifications des histones et méthylation de l'ADN). Ces altérations, en concert avec les complexes de remodelage de la chromatine, l'architecture nucléaire et les micros ARN, définissent la structure de la chromatine au niveau des gènes, et donc leur activité transcriptionnelle.

### 1.2 La chromatine

Chez les eucaryotes supérieurs, la molécule d'ADN mesure environ deux mètre de long et, par le fait même, se doit d'être condensée afin d'être contenue dans le noyau des cellules (**Figure 1**). Une solution élégante au problème de densification de l'ADN réside en son enroulement autour de protéines histones, donnant lieu à un polymère répété protéine-ADN connu sous le nom de chromatine [7]. La chromatine n'est pas une structure uniforme. En règle

générale, elle est classée comme étant soit euchromatique ou soit hétérochromatique. L'euchromatine correspond à une chromatine décondensée, qui peut être transcriptionnellement active ou inactive, tandis que l'hétérochromatine peut être définie comme étant de la chromatine très comprimée et inactive. Cette dernière peut exister sous forme permanente (hétérochromatine constitutive), où les gènes sont rarement exprimés dans les cellules, ou encore sous forme réprimée (hétérochromatine facultative) dans certaines cellules durant le cycle cellulaire ou à une étape spécifique du développement [6]. La chromatine peut donc être vue comme un polymère dynamique pouvant indexer le génome et ainsi potentialiser les signaux provenant de l'environnement afin de déterminer quels seront les gènes qui seront exprimés [6]. Ceci procure une couche multidimensionnelle à la lecture de l'ADN.



**Figure 1.** Organisation de la chromatine. L'information génétique des cellules eucaryotes est condensée en chromosomes, où l'on retrouve la double hélice d'ADN enroulée autour du noyau d'histones (formation d'une structure en collier de perle) qui est souvent repliée pour former une chromatine d'ordre supérieur. Les changements dynamiques de la chromatine sont directement influencés par la modification post-traductionnelle des régions N-terminales des histones. Des acides aminés spécifiques des queues d'histones sont ciblés par des modifications covalentes telles que l'acétylation (Ac), la phosphorylation (P), l'ubiquitination (Ub), la méthylation (Me). Selon la combinaison de ces marques, on retrouvera en général une chromatine transcriptionnellement active ou inactive (code des histones). Adapté de Sparmann *et al.* (2006) [8].

### 1.2.1 Euchromatine et hétérochromatine

L'euchromatine (**Figure 1**) consiste principalement en des séquences codantes, qui comptent seulement pour une petite fraction du génome des mammifères (moins de 4%) [6]. Il est

suggéré que l'euchromatine existe sous une forme dite ouverte (décompressée), plus sensible aux nucléases, permettant l'expression des gènes, bien qu'elle ne soit pas nécessairement active. Certains gènes sont exprimés de façon ubiquitaire et d'autres sont régulés durant le développement ou encore induits en réponse à des signaux externes. La transcription des gènes est favorisée par la coopération des séquences de l'ADN agissant en *cis* (promoteurs, enhancers, LCR (locus control regions)) et des facteurs agissant en *trans*, en concert avec l'ARN polymérase et les facteurs associés [9]. Ensemble, ces facteurs ont été sélectionnés à travers l'évolution afin d'orchestrer une série de réactions élaborées qui se doivent d'être produites dans un arrangement spatial et temporel approprié.

La portion de l'ADN riche en bases AT au niveau des promoteurs est souvent dépourvue de nucléosomes et existe possiblement dans une conformation non-canonical favorisant la liaison des facteurs de transcription [10, 11]. Cependant, la liaison des facteurs de transcription seule n'est pas suffisante pour assurer la transcription des gènes. L'engagement de la machinerie de transcription sur l'ADN doit être facilité entre autres par le recrutement de complexes de remodelage de la chromatine. Le terme « euchromatine » représente un état de la chromatine complexe qui englobe un mélange dynamique et élaboré de complexes dédiés qui interagissent ensemble, étroitement, avec la fibre de chromatine afin de permettre la transcription d'ARN fonctionnels.

De son côté, l'hétérochromatine (**Figure 1**) est constituée essentiellement d'ADN non-codant et répétitif (96% du génome) [6]. De la levure à l'humain, elle semble jouer un rôle dans l'organisation et le bon fonctionnement du génome. Les étapes de la formation de l'hétérochromatine semblent conservées, bien que l'ordre exact et les détails puissent variés. En général, cette voie met en jeu la désacétylation des queues d'histones, la méthylation de résidus lysines spécifiques, le recrutement de protéines associées à l'hétérochromatine et l'établissement de la méthylation de l'ADN. Plusieurs rôles sont attribués à l'hétérochromatine, dont la maintenance de la bonne dynamique chromosomique au niveau de domaines spécialisés du génome, empreints d'une signature épigénétique. Par exemple, l'hétérochromatine agit comme une cloison au niveau des centromères, assurant la stabilité des domaines hétérochromatiques marqués par une signature épigénétique répressive afin de faciliter la ségrégation des chromosomes lors de la mitose et de la méiose [12, 13]. De façon intéressante, le fait de déplacer des gènes de leur position initiale située dans l'euchromatine vers de nouvelles positions au

niveau ou près des centromères et télomères de l'hétérochromatine, entraîne leur répression [14, 15]. Ceci souligne bien l'importance de l'hétérochromatine dans les fonctions de maintenance du génome, aussi importantes que celles de l'euchromatine.

### 1.3 Modifications des histones

L'unité de base de la chromatine, le nucléosome [7], est formée de deux tours de la super-hélice de l'ADN (147 paires de bases (pb)) enroulés autour d'un octamère de protéines histones : un tétramère H3-H4 et deux dimères H2A-H2B [16]. C'est l'histone H1 qui permet la liaison entre les nucléosomes, participant ainsi à la densification de la chromatine d'ordre supérieur [17]. Les histones sont de petites protéines constituées d'un domaine globulaire et d'un domaine N-terminal plus flexible qui dépasse du nucléosome. C'est la partie N-terminale, queue de l'histone, qui subit notamment plusieurs modifications post-traductionnelles (**Figure 1**).

Depuis les études pionnières effectuées par Allfrey et ses collègues [18], plusieurs types de modifications covalentes des histones ont été identifiés et caractérisés, incluant la phosphorylation, l'acétylation, l'ubiquitination, la méthylation, la sumoylation, l'ADP-ribosylation, la biotinylation, l'isomérisation de proline et probablement plusieurs autres qui n'ont pas encore été décrits [19]. Ces modifications covalentes se produisent à des sites spécifiques et les enzymes responsables de ces modifications sont présentées dans le **Tableau I**. Ces enzymes sont hautement spécifiques pour des résidus d'acides aminés à des positions précises [3, 4] et ces modifications peuvent même influencer la structure de la chromatine, selon leur concentration et leur combinaison. En effet, lorsque l'on compare les modifications des histones de l'euchromatine et l'hétérochromatine, elles reflètent l'état transcriptionnel du génome, c'est-à-dire régions transcrtes et non-transcrtes respectivement.

Plusieurs des modifications de la chromatine sont réversibles et clivées par des enzymes spécifiques, telles que les histones déacétylases (HDAC), les histones phosphatases (PP), les ubiquitines hydrolases (Ubq) et les poly(ADP-ribose)glycohydrolases (PARG) [20-22]. Par conséquent, il est peu probable que ces modifications soient transmises par la lignée germinale. Les empreintes transitoires sont très intéressantes puisqu'elles imposent des changements à la chromatine en réponse à des stimuli intrinsèques et externes [23]. De cette façon, elles régulent l'accès et/ou la disponibilité de la machinerie de transcription nécessaire afin de déchiffrer la matrice d'ADN sous-jacente [9]. Certaines modifications des histones peuvent cependant être

stables pendant plusieurs divisions cellulaires. C'est le cas pour la méthylation de lysines. Par conséquent, un état épigénétique, ou une mémoire cellulaire, peut être établi.

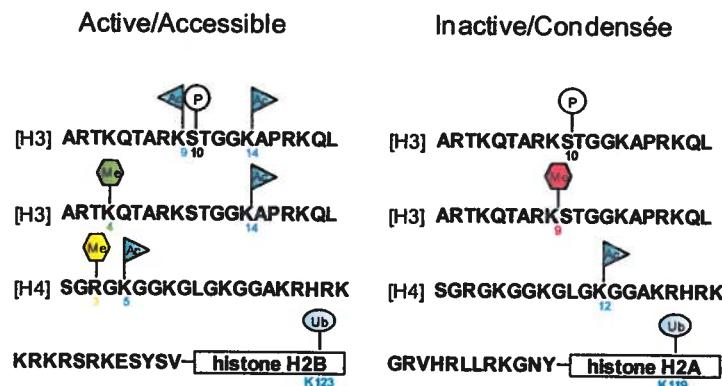
**Tableau I.** Liste des principales enzymes responsables de la modification des histones. Adapté de Biel *et al.* 2005 [24].

Groupes	Familles	Enzymes	Fonctions/Spécificités	Références
<b>HAT</b>	<i>GNAT</i>	Gcn5L	Activation transcriptionnelle	[25, 26]
		PCAF	Activation transcriptionnelle	[27]
		ATF-2	Activation transcriptionnelle	[28]
	<i>MYST</i>	MOZ	Activation transcriptionnelle	[29]
		Tip60	Activation transcriptionnelle/ réparation de l'ADN	[30]
<b>HMT</b>	<i>CBP/p300</i>		Activation transcriptionnelle	[31, 32]
		SUV39	H3-K9	[33]
		SET7/9	H3-K4	[34, 35]
	<i>HKMT</i>	G9a	H3-K9; H3-K27	[36, 37]
		Ezh2	H3-K27	[38]
		PRMT1	H4-R3	[39]
		PRMT4/CARM1	H3-R2, H3-R17, H3-R26	[40, 41]
		PRMT5/JBP1	H2A, H4	[42, 43]
<b>Histone phosphorylation</b>	<i>Kinases Aurora</i>		H3-S10; H3-S28 Condensation des chromosomes; division cellulaire	[44, 45]
		MAPK	Activation transcriptionnelle	[46]
		PKB/Akt	Activation transcriptionnelle	[47, 48]
<b>Histone ubiquitination</b>	<i>Ub</i>		Chromatine active	[49]
<b>Histone sumoylation</b>	<i>SUMO</i>		Chromatine inactive	[50]
<b>Histone poly-ADP-ribosylation</b>	<i>PARP-1</i>		Altération de la structure de la chromatine; activation et répression transcriptionnelle	[51-53]

HAT, histone acetyltransferase; GNAT, Gcn5-related N-acetyltransferase family; PCAF, p300/CBP-associated factor; ATF-2, activating transcription factor 2; MYST, MOZ, Ybf2/Sas3, Sas2 and Tip60 family; MOZ, monocytic leukemia zinc-finger protein; Tip60, HIV-Tat interacting protein; CBP/p300, CREB binding protein/p300; HMT, histone methyltransferase; HKMT, histone lysine methyltransferase; Ezh2, enhancer of Zeste homolog 2; HRMT, histone arginine methyltransferase; PRMT1/4/5, protein arginine N-methyltransferase 1, 4 and 5; CARM1, coactivator-associated arginine methyltransferase 1; JBP1, J binding protein 1; MAPK, mitogen-activated protein kinase; PKB/akt, protein kinase B/akt; Ub, ubiquitin; SUMO, Small ubiquitin-like modifier; PARP-1, poly(ADP-ribose) polymerase 1.

Les modifications covalentes au niveau des queues d'histones peuvent causer des effets en *cis* et en *trans*. Les effets en *cis* impliquent des modifications de la propriété physique des queues d'histones, comme la modulation de la charge électrostatique ou de la structure de la queue qui, à leur tour, altèrent les contacts entre les nucléosomes. Un exemple bien connu, l'acétylation des histones, permet de neutraliser les charges positives des queues d'histones. Cela

génère une expansion localisée de la chromatine et offre une meilleure accessibilité à la double hélice d'ADN pour la machinerie de transcription. Il est d'ailleurs pensé que l'assemblage des différents états épigénétiques pourrait former un « code » (code des nucléosomes) [4], conduisant à une spécificité combinatoire des empreintes définissant l'euchromatine et l'hétérochromatine [5] (**Figure 1 et 2**). Les effets en *trans* engendrés par les modifications des histones correspondent au recrutement des partenaires de liaisons aux modifications de la chromatine. Certains partenaires de liaison ont une affinité particulière et se lient aux queues d'histones spécifiques. Ils servent souvent de « velcro » pour un polypeptide, afin de permettre la liaison d'un complexe enzymatique plus grand, qui est nécessaire pour lier le polymère de chromatine [6]. Par exemple, on retrouve souvent un bromodomaine (motif reconnaissant les résidus acétylés des histones) au niveau de l'enzyme histone acétyltransférase (HAT), responsable de l'acétylation d'histones, qui fait elle-même partie intégrante d'un grand complexe de remodelage de la chromatine [54, 55].



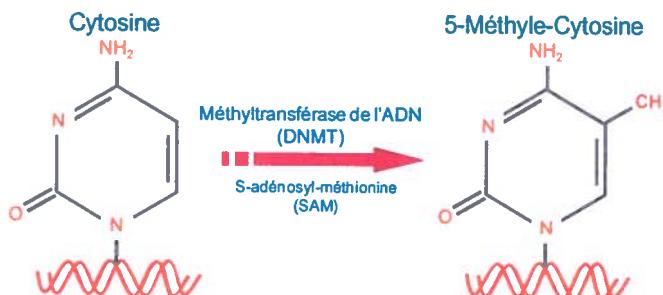
**Figure 2.** Modifications d'histones. Quelques exemples de modifications d'histones combinatoires au niveau du domaine terminal NH<sub>2</sub> qui représentent des empreintes pour la chromatine active ou inactive. Ac, acétylation; P, phosphorylation; Me (rouge), méthylation lysine répressive; Me (verte), méthylation lysine activatrice; Me (jaune), méthylation arginine; Ub, ubiquitination. Adapté de Allis *et al.* (2007) [6].

Les modifications des régions des histones au niveau de la queue et du centre globulaire peuvent aussi cibler des complexes de remodelage dépendants de l'ATP (Adénosine triphosphate) requis pour la transition de l'euchromatine en suspens à transcriptionnellement active. Cette mobilisation des nucléosomes peut se produire par le glissement des octamères, l'altération de la structure des nucléosomes par la formation de boucle d'ADN ou par le remplacement d'histones spécifiques par des variantes [56]. La compréhension de l'interconnexion de ces mécanismes agissant en concert afin de faire varier l'état épigénétique de la chromatine reste cependant encore imparfaite.

## 1.4 Méthylation de l'ADN

### 1.4.1 Introduction

La méthylation de l'ADN est la mieux caractérisée des modifications épigénétiques. Elle correspond à l'ajout d'un groupement méthyle au niveau des cytosines. Cette réaction est catalysée par les méthyltransférases de l'ADN (DNMT) en présence du donneur de méthyle S-adénosylméthionine (SAM) et résulte en la formation d'une 5-méthyle-cytosine (5-meC) (**Figure 3**). Chez les mammifères, la méthylation cible principalement les cytosines comprises dans les dinucléotides CpG, contrairement aux vertébrés où on la retrouve aussi au niveau d'autres doublets [57, 58]. Chez les mammifères, la méthylation de cytosines au niveau de séquences non-CpG se produit essentiellement dans les cellules souches, ou semblables aux cellules souches [59], où environ 25% des sites méthylés se trouvent principalement dans des doublets d'adénosine [60].



**Figure 3.** Mécanisme de la méthylation de cytosine dans le génome des mammifères. Une famille de trois enzymes actives, les méthyltransférases de l'ADN (DNMT), catalyse la méthylation de la position 5 de l'anneau de cytosine, utilisant le S-adénosylméthionine (SAM) comme donneur de groupe méthyle ( $\text{CH}_3$ ). Adapté de Herman and Baylin (2003) [61].

Il existe environ  $2,8 \times 10^7$  sites de méthylation potentiels dans le génome humain [1]. Des études ont démontré que dans un génome normal, environ 1% de toutes les cytosines sont méthyloses [23, 62, 63]. Le Projet sur l'Épigénome Humain (HEP; *Human Epigenome Project*) a été le premier à reconnaître la nécessité d'avoir une référence normale de l'épigénome dans différents tissus et individus [64]. Dans une étude pilote, sept tissus différents provenant de 32 individus ont été évalués afin d'investiguer le statut de méthylation des promoteurs et des gènes. De façon surprenante, les résultats ont démontré qu'environ 10% des régions analysées comportaient des différences tissus-spécifiques de la méthylation de l'ADN. De celles-ci, seulement 31% étaient localisées dans la région en amont des gènes [64]. Une étude subséquente a aussi permis de démontrer qu'environ 30% des loci au niveau des chromosomes 6, 20 et 22 montraient de la méthylation hétérogène, avec une fréquence entre 20% et 80% [65]. Ces

résultats démontrent bien l'hétérogénéité des patrons de méthylation dans différents types cellulaires.

#### 1.4.2 Les îlots CpG

Dans le génome des mammifères, environ 70% des sites CpG sont méthylés. Ceci inclus tous les types de séquences telles que les gènes en une seule copie et les séquences intergéniques, de même que les éléments répétitifs, qui démontrent la plus forte densité de méthylation. Les îlots CpG, régions de l'ADN riche en CG que l'on retrouve près des promoteurs et des premiers exons, sont des exceptions [66]. Approximativement la moitié des gènes chez l'humain et la souris contiennent des îlots CpG [67]. Ceux-ci correspondent surtout à des gènes constitutivement exprimés, mais représentent aussi environ 40% des gènes ayant un patron d'expression tissu-spécifique [68]. Les îlots CpG se situant au niveau des promoteurs ne sont habituellement pas méthylés dans les tissus normaux. La chromatine contenant ces îlots est généralement très acétylée, sans histone H1 ni nucléosome [69]. Les principales exceptions incluent les gènes non-transcrits sur le chromosome X inactif et les gènes des empreintes autosomales, où l'un des allèles parentaux peut être méthylé [70]. Les gènes ne contenant pas d'îlots CpG sont variablement méthylés, souvent sous un patron tissu-spécifique et, habituellement, la méthylation corrèle inversement avec le statut d'expression [71]. L'algorithme traditionnel des îlots CpG [72, 73] a été révisé par Takai et Jones en 2002 [74]. Ceux-ci ont utilisé des critères plus rigoureux afin de définir les îlots CpG, soient une longueur plus grande ou égale à 500 pb, un contenu en GC plus grand ou égal à 55% et un ratio de CpG observé/attendu plus grand ou égal à 0,65. Cette définition a permis d'exclure un nombre substantiel de petites régions exoniques et d'ADN parasitiques répétitifs.

#### 1.4.3 Les méthyltransférases de l'ADN

Chez les mammifères, trois familles de méthyltransférases de l'ADN ont été identifiées : DNMT1, DNMT2 et DNMT3. Le premier membre à avoir été cloné chez la souris est DNMT1 [75]. La DNMT1 est l'enzyme responsable de la maintenance des patrons de méthylation durant la réPLICATION de l'ADN [76]. Elle est aussi la plus abondante des méthyltransférases de l'ADN dans les cellules somatiques et c'est d'ailleurs l'enzyme principale étudiée dans la présente thèse. Par conséquent, la section 2 lui est entièrement consacrée. La DNMT2 possède une très faible

activité méthyltransférase *in vitro* et semble plutôt responsable de la méthylation de résidus cytosines au niveau de la boucle de l'anticodon de l'ARNT-Asp [77, 78]. De plus, d'autres études ont démontré l'implication de DNMT2 dans la méthylation et la maturation des ARNT durant un stress cellulaire [79, 80]. La famille DNMT3 comprend deux méthyltransférases actives, DNMT3A et DNMT3B, qui participent à l'établissement des patrons de méthylation *de novo* durant le développement embryonnaire précoce. Il existe également une forme inactive, DNMT3L, qui fonctionne comme un activateur de DNMT3A et 3B [81, 82]. La délétion de DNMT1, 3A ou 3B chez la souris est létale pour l'embryon (**Tableau II**), tandis qu'aucun phénotype n'a été observé pour DNMT2. La DNMT1 montre une forte préférence pour l'ADN hémiméthylé [83], contrairement à DNMT3A et 3B qui n'en n'ont aucune [84].

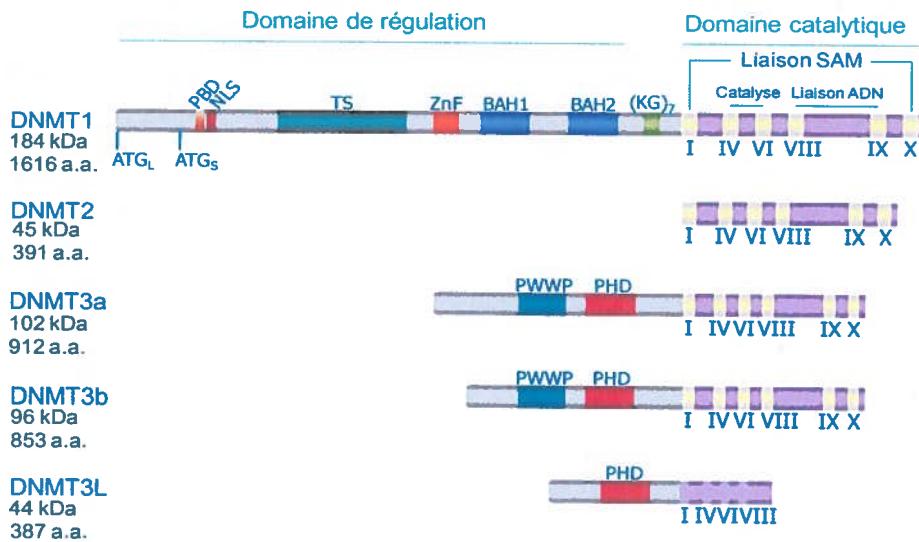
**Tableau II.** Descriptions et fonctions des méthyltransférases de l'ADN. Adapté de El-Osta (2003) [85].

Protéines	Fonctions générales	Phénotypes des mutants	Références
DNMT1	Maintenance de la méthylation	Létal au niveau de l'embryon, perte des empreintes et expression des gènes liés à l'X	[86]
DNMT1o	Isoforme spécifique à l'ovocyte	Perte des empreintes maternelles; infertilité chez la femelle homozygote	[87]
DNMT1p	Isoforme spermatocyte pachytène	N.D.	
DNMT2	Méthylation non-CpG d'ARNT	Aucun phénotype cellules ES	[88]
DNMT3a, DNMT3b	Méthyltranférases <i>de novo</i> , établissement de la méthylation	Létal au niveau de l'embryon; syndrome ICF (DNMT3b)	[84]
DNMT3L	Aucune activité catalytique, Interagit avec et active DNMT3a et DNMT3b	Emprintes maternelles aberrantes	[89, 90]

Syndrome ICF, Immunodeficiency, centromeric region instability, and facial anomalies syndrome.

Les DNMT actives des mammifères comportent au moins trois régions structurales: le domaine de régulation situé en N-terminal, responsable entre autre de la localisation des DNMT dans le noyau cellulaire et des interactions protéiques; le domaine catalytique situé en C-terminal; et la région de liaison centrale, qui consiste en la répétition de dipeptides GK [91] (**Figure 4**). Le domaine N-terminal de DNMT1 contient également un domaine de liaison à PCNA (Proliferating cell nuclear antigen) (PBD), un signal de localisation nucléaire (NLS), un motif de liaison à l'ADN à doigt de zinc riche en cystéine (ZnF), une séquence de ciblage aux foyers de réPLICATION (TS) et des domaines bromo adjacent homologie (BAH). Le domaine N-terminal des DNMT3 contient quant à lui un domaine homologie polybromo (PHD) et un domaine de liaison à la

chromatine formé par un motif tétrapéptidique (PWPP). De son côté, le domaine catalytique des méthyltransférases eucaryotes contient dix différents motifs caractéristiques, dont six ont été conservés durant l'évolution, soit les motifs I, IV, VI, VIII, IX et X (**Figure 4**).



**Figure 4.** Organisation des domaines des DNMT. Les DNMT des mammifères possèdent une partie N-terminale de régulation et une partie C-terminale catalytique. La portion C-terminale montre une grande homologie de séquence en acides aminés avec les méthyltransférases de l'ADN procaryotes et contiennent aussi tous les motifs d'acides aminés catalytiques conservés (en chiffres romains) définis pour les enzymes procaryotes. DNMT1 : ATG<sub>L</sub>, isoforme long; ATG<sub>S</sub>, isoforme court; PBD, site de liaison à PCNA; ZnF, domaine à doigt de zinc; NLS, signal de localisation nucléaire; TS, séquence de ciblage aux foyers de réplication; BAH, domaines bromo adjacent homology; KG, région charnière riche en lysine/glycine. DNMT3 : PWPP, résidus proline/tryptophane conservés; PHD, plant homeodomain. Adapté de Hermann *et al.* (2004) [92].

DNMT3A et 3B montrent un haut degré d'homologie de structure, mais ces enzymes sont encodées par des gènes différents situés sur des chromosomes distincts, soit respectivement 2p23 et 20q11.2 [93]. Bien que les DNMT3 soient responsables de la méthylation *de novo* durant l'embryogenèse, l'expression de DNMT3A est ubiquitaire tandis que celle de DNMT3B est détectée à un faible niveau dans la majorité des tissus, sauf dans les testicules, la thyroïde et la moelle osseuse [91]. Ces deux protéines se distinguent aussi par leurs partenaires de liaison. DNMT3A peut lier le co-répresseur RP58 [94], le facteur oncogénique PML-RAR (Promyelocytic leukemia-retinoic acid receptor) [95] et la protéine HP1 $\beta$  (Heterochromatin protein 1 $\beta$ ) [96]. DNMT3B quant à lui interagit avec Sin3a, la condensine, KIF4A (Chromosomal-associated kinesin KIF4A), l'enzyme de remodelage de la chromatine dépendant de l'ATP (hSNF2H; human sucrose nonfermenting protein 2 homolog) [97] et SUMO-Ubc9 (Small ubiquitin-like modifier) [98]. Il a aussi été démontré que DNMT3A et 3B pouvaient interagir avec DNMT1 [99] et HDAC1 [94, 100]. Par ailleurs, DNMT3L ne possède pas

d'activité catalytique puisque plusieurs motifs en jeu dans la catalyse sont absents du domaine C-terminal (**Figure 4**). Cependant, elle coopère avec les autres DNMT [81, 90, 101]. On retrouve notamment DNMT3L sur le chromosome 21q22.3 et elle est surtout exprimée dans les cellules de la lignée germinale post-natale femelle lors de l'établissement des patrons de méthylation de l'ADN.

#### 1.4.4 Rôles de la méthylation de l'ADN

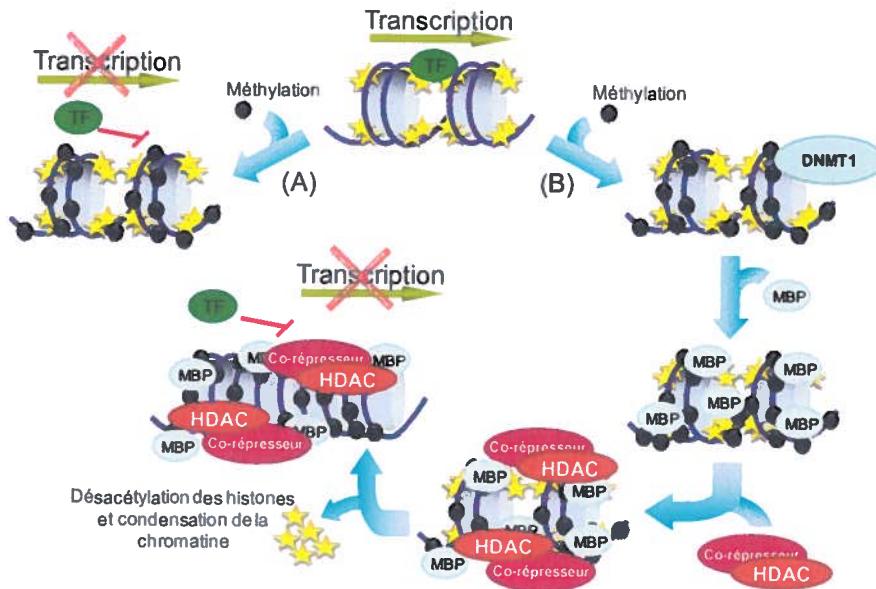
La méthylation de l'ADN joue un rôle important dans plusieurs fonctions cellulaires centrales [23, 63]. Bien qu'elle ait été initialement étudiée dans un contexte de transcription des gènes, cette modification épigénétique est aussi impliquée dans l'inactivation des éléments transposables et dans la défense contre les séquences virales [23, 63, 102]. La méthylation de l'ADN a de plus en plus d'importance en raison de l'implication des patrons de méthylation aberrants dans les maladies humaines, notamment le cancer [102-105].

### Répression de la transcription et modulation de l'expression des gènes

La méthylation de l'ADN peut réguler la transcription des gènes de deux façons. D'une part, elle peut directement réprimer la transcription des gènes en empêchant les activateurs de la transcription de se lier à leur séquence consensus au niveau de l'ADN [106] ou indirectement via l'altération de la structure de la chromatine (soit par un changement dans la charge électrostatique ou encore par des contacts inter-nucléosomaux) (**Figure 5a**). En effet, ceci est le cas pour plusieurs facteurs de transcription, tels que AP-2 (Activating protein-2), c-Myc, CREB (cAMP response element-binding), E2F, CTCF et NF-κB (Nuclear factor-kappa B), qui reconnaissent des séquences contenant des résidus CpG, où la méthylation peut inhiber leur liaison à l'ADN [107]. D'autre part, l'ADN hyperméthylé peut spécifiquement être reconnu par des protéines de liaison aux groupes méthyles (MBP) qui recrutent à leur tour des complexes répresseurs de modification et de remodelage de la chromatine, résultant en la répression de la chromatine et l'inhibition de l'expression des gènes [108-110] (**Figure 5b**).

Plusieurs types de domaines et de familles MBP sont capables de lier les CpG méthylés (mCpG) : le domaine de liaison aux groupes méthyles (MBD) et les familles de protéines UHRF (Ubiquitine-like with PHD and ring-finger domains) et Kaiso. Les protéines de liaison aux mCpG ont été identifiées chez l'humain il y a déjà plus d'une décennie [111, 112]. À l'exception de MBD3 qui contient une substitution d'acides aminés l'empêchant de se lier aux mCpG [113], les

protéines MBD (MBD1-MBD4) et MeCp2 (Methyl CpG binding protein 2) reconnaissent toutes spécifiquement les mCpG. Toutes les MBD, excepté MBD3, forment également des complexes avec HDAC et des protéines associées au remodelage des nucléosomes telles que MeCP1 et NuRD (Nucleosome remodeling and deacetylase) [113]. De son côté, la protéine Kaiso, malgré l'absence de domaine MBD, reconnaît l'ADN méthylé grâce à des domaines à doigt de zinc, nécessitant deux mCpG consécutifs pour une liaison efficace [114]. Il a été démontré que la reconnaissance de mCpG par la protéine Kaiso pouvait moduler la répression des gènes méthylés par son association avec le complexe co-répresseur HDAC/N-CoR (Nuclear receptor corepressor) [115]. D'ailleurs, toutes les protéines MBP sont capables de moduler l'expression génique par le recrutement de complexes co-répresseurs de remodelage de la chromatine aux régions méthylées [109, 115-123]. UHRF (UHRF1 et UHRF2), une autre protéine capable de reconnaître les mCpG avec une préférence pour l'ADN hémiméthylé nouvellement formé, a aussi été identifiée [124, 125]. La reconnaissance des CpG hémiméthylés par UHRF1 met en jeu un domaine SRA (SET and RING-associated domain) à très haute spécificité. Il a d'ailleurs été démontré que UHRF1 recrutait DNMT1 au niveau des CpG hémiméthylés via ce même domaine [125, 126].



**Figure 5.** Mécanismes épigénétiques de l'inhibition de la transcription des gènes. (A) La méthylation au niveau du site consensus de certains facteurs de transcription (TF) peut directement bloquer leur liaison à l'ADN ou indirectement, via le remodelage de la chromatine. En empêchant les activateurs de lier leurs sites, la méthylation de l'ADN inhibe directement la transcription des gènes. (B) L'inhibition d'un gène suite à la méthylation de l'ADN peut être une conséquence de l'interaction de protéines de liaison aux groupes méthyles (MBP) au niveau des cytosines méthylées, qui recrutent à leur tour des co-répresseurs et les histones déacétylases (HDAC). La désacétylation des histones par HDAC entraîne un remodelage de la chromatine et la formation d'une structure non-permissive (hétérochromatine) qui empêche la liaison des TF au niveau des promoteurs, et donc la transcription des gènes. Adapté de Vaissière *et al.* (2008) [127].

Plusieurs études suggèrent un rôle de répression de la transcription pour les îlots CpG présent au niveau des promoteurs de gènes [128-130]. La méthylation de l'ADN de promoteurs de gènes riches en CpG, tels que *MASPIN* et *GATA2*, corrèle d'ailleurs avec leur inhibition tissu-spécifique [131, 132]. Cependant, comme plusieurs gènes ne démontrent aucune corrélation entre l'hyperméthylation d'îlot CpG et le statut de transcription [133-135], il est difficile de conclure que la fonction majeure des îlots CpG est de réprimer la transcription.

### **Développement embryonnaire et contrôle de l'expression monoallélique**

Durant le développement des organismes multicellulaires, les tissus et cellules acquièrent différents programmes d'expression des gènes. La méthylation de l'ADN joue un rôle important à ce stade en concert avec les modifications des histones. Chaque cellule possède sa propre signature épigénétique qui reflète son génotype, son histoire développementale et l'influence de l'environnement, qui mène ultimement au phénotype de la cellule et de l'organisme. Pour la plupart des types cellulaires, ces marques épigénétiques deviennent fixes suite à la différentiation ou à la sortie du cycle cellulaire. Par contre, durant le développement normal, les cellules entrent en reprogrammation épigénétique, où les marques de l'épigénétique sont modifiées [136-138]. Suite à la fertilisation, les marques épigénétiques des gamètes mâles et femelles sont effacées pour assurer la pluripotence et sont remplacées par de nouveaux patrons de méthylation *de novo* lignée-spécifiques, durant ou après la gastrulation. Une reprogrammation majeure se produit également dans les cellules germinales primordiales (PGC). Ce processus est essentiel pour la génération de nouvelles cellules. Il confère la totipotence pendant la pré-implantation de l'embryon afin d'assurer que les deux sexes acquièrent un état épigénétique équivalent avant la différentiation des gamètes et l'établissement des empreintes parentales. Ceci assure aussi d'effacer les possibles épimutations que les cellules adultes ont acquises durant leur cycle de vie, évitant la propagation des erreurs dans la lignée germinale.

Suite à la fertilisation, les cellules germinales donnent naissance à un nouvel individu. Bien que le génome des gamètes mâles et femelles soit identique, plusieurs fonctions sont spécifiques à chacun. Le système permettant ces fonctions différentes met en jeu l'épigénétique et porte le nom d'empreintes génomiques. Le phénomène d'empreintes génomiques correspond à l'expression différentielle des allèles parentaux maternels et paternels de certains gènes, dû à des différences épigénétiques, spécifiques au sexe, héritées de la lignée germinale. Contrairement à la

plupart des gènes, qui sont soit exprimés ou inhibés sur les deux allèles parentaux (expression biallétique), l'expression monoallélique des gènes ciblés par les empreintes génomiques se produit de manière spécifique aux tissus et aux stades de développement [139, 140]. On retrouvera souvent les promoteurs des gènes, ciblés par les empreintes génomiques, méthylés sur l'allèle inactif, afin de maintenir cet état d'inactivité. Deux exemples d'empreintes génomiques sont les gènes *H19* et *Igf2r* (Insulin-like growth factor-2 receptor). Les promoteurs maternels et paternels de ces deux gènes ne sont pas différemment méthylés dans les gamètes, mais le deviennent durant le développement embryonnaire [141-143].

On retrouve également le phénomène d'expression monoallélique lors de l'inactivation du chromosome X femelle. L'inactivation du chromosome X est aléatoire dans les cellules somatiques, tandis qu'elle est dictée par l'origine parentale dans la lignée extra-embryonnaire [23]. L'expression monoallélique est aussi importante pour le fonctionnement du système immunitaire afin de prévenir l'autoimmunité que pourrait engendrer, par exemple, l'expression de deux récepteurs de cellules B (BCR) à la surface, un reconnaissant les pathogènes et l'autre spécifique aux cellules hôtes. La méthylation de l'ADN affecterait cependant directement le réarrangement des gènes plutôt que leur transcription [144, 145].

### Maintenance de la stabilité et de l'intégrité du génome

Le génome des mammifères comporte une grande majorité de régions non-codantes et répétitives. Les séquences répétées correspondent soit à des éléments transposables, dont la distribution à travers le génome est hétérogène, ou soit en de simples séquences répétées, comme les satellites de l'ADN, qui sont communément retrouvés dans l'hétérochromatine péricentromérique ou subtélomérique. Ces régions sont habituellement méthylées et inactivées. Les éléments transposables sont des séquences d'ADN qui ont l'habileté d'intégrer le génome à différents sites. Chez les mammifères, ils comptent pour presque la moitié du contenu en ADN [146]. Il existe trois types de ces éléments dans le génome humain : les transposons de l'ADN, les rétrotransposons et les rétrovirus endogènes. Les transposons de l'ADN sont les plus anciens éléments transposables du génome et sont, pour la plupart, endommagés par des délétions internes et ou des troncations, les rendant immobiles [147]. Les rétrotransposons sont, de leur côté, divisés en deux classes : ceux flanqués de longues répétitions terminales (LTR) provenant de rétrovirus endogènes, et ceux sans LTR (rétrotransposons LINE (Long interspersed nuclear

element) et SINE (Short interspersed nuclear element)), qui sont les plus abondants du génome (30%). Ces séquences sont capables de se déplacer et d'intégrer d'autres parties du génome selon un mécanisme de copier-coller. Bien que plusieurs soient endommagés, ils possèdent des promoteurs forts qui peuvent permettre la transcription. Afin d'éviter le déplacement et la transcription de gènes non-désirés par ces éléments, ces régions sont inactivées par la méthylation de l'ADN et les modifications des histones. Ceci procure au génome une bonne stabilité, lui permettant ainsi de garder son intégrité.

#### 1.4.5 Maladies génétiques

Les altérations dans les mécanismes épigénétiques ont des conséquences importantes pour l'organisme. Plusieurs maladies humaines ont en effet été associées à un défaut au niveau de certaines protéines en jeu dans le contrôle épigénétique [148]. Le syndrome d'anomalies faciales combiné à l'immuno-déficience et l'instabilité centromérique (ICF) est un désordre autosomal récessif. Il est caractérisé par une instabilité des régions péricentromériques des chromosomes 1, 9 et 16, une immunodéficience qui se traduit cliniquement en des infections respiratoires et gastro-intestinales chroniques et une dysmorphie faciale. Dans la majorité des cas d'ICF, on observe des mutations dans le gène de *DNMT3b* au niveau du domaine catalytique [149]. Une conséquence de ces mutations est une hypométhylation prononcée et spécifique des régions péricentromériques des chromosomes 1, 9 et 16. Cette hypométhylation induit la décondensation des chromosomes, en plus d'une augmentation de la recombinaison. Il semble que ces anomalies soient spécifiques à certains tissus, car elles sont surtout observées dans les lymphocytes [150].

Une autre maladie génétique associée à une dérégulation des mécanismes épigénétiques est le syndrome de Rett (ou RTT). Cette maladie est caractérisée par un désordre neurodéveloppemental chez les jeunes filles qui se produit entre 6 et 8 mois. C'est en fait la seconde cause de retard mental chez les femmes (1/10000) [151]. Dans 90 à 95% des cas, des mutations dans le gène *MeCP2* sont observées [152]. Étant donné le rôle important de *MeCP2* dans la formation de l'hétérochromatine et dans l'inhibition des gènes, l'altération de la répression transcriptionnelle pourrait être à la base de la maladie.

#### 1.4.6 Cancers

La progression tumorale est souvent associée à des altérations dans les patrons de méthylation du génome. Ces altérations de la méthylation de l'ADN peuvent varier significativement non seulement d'un type de cancer à un autre, mais également d'un patient à un autre. Des analyses cumulatives ont révélé que les cellules cancéreuses montrent simultanément une hypométhylation globale du génome et une hyperméthylation régionale des îlots CpG de gènes spécifiques. La première indication d'un tel rôle dans la tumorogenèse provient des recherches effectuées par Herman *et al.* (1994) [153] sur le carcinome rénal (RCC). Le groupe a montré que 20% des patients atteints de la forme RCC non-héréditaire ne possédaient pas de mutation au niveau du gène suppresseur de tumeur von-Hippel Lindau (VHL), mais que ce gène était plutôt inhibé par l'hyperméthylation. Depuis, une grande quantité d'études ont établi un lien entre la méthylation de l'ADN et le cancer.

### **Transitions C→T**

Un mécanisme que l'on associe au développement de cancers et à la méthylation de l'ADN est celui de mutations reliées à la déamination hydrolytique des cytosines méthylées [154]. Ce phénomène, reconnu tout d'abord dans les systèmes procaryotes, est aussi observé chez les mammifères. Il est responsable d'un taux élevé de transitions mC→T qui contribuent à l'augmentation des mutations retrouvées dans le génome. Un exemple bien connu de ce processus et de son implication dans l'oncogenèse est le gène suppresseur de tumeurs *p53*. Des mutations au niveau de ce gène se produisent dans plus de 50% des tumeurs solides humaines [155]. Environ 24% de celles-ci sont attribuées à des transitions C→T dans les dinucléotides CpG, ce qui suggère un rôle important pour la méthylation de l'ADN dans la création de ces mutations [156].

### **Hypométhylation de l'ADN**

La diminution de la méthylation globale du génome est un phénomène fréquemment observé dans la tumorogenèse [157]. L'hypométhylation du génome a de multiples conséquences potentielles, dont l'instabilité chromosomique, l'activation aberrante d'éléments rétroviraux endogènes et d'oncogènes, ainsi que la perte des empreintes génomiques (LOI; Loss of imprinting) [158, 159]. En effet, plusieurs études suggèrent que l'hypométhylation globale de l'ADN mènerait à l'instabilité du génome chez la souris et chez l'humain [160-162].

L'hypométhylation de l'ADN faciliterait la recombinaison mitotique illégitime, conduisant à des bris de chromosomes, des translocations et/ou la perte d'allèles (perte de l'hétérozygotie) [163]. La réduction des niveaux de méthylation globale est d'ailleurs en grande partie attribuée à la perte de la méthylation normale des éléments répétés fortement méthylés, incluant les séquences satellites et les rétrotransposons. Des insertions d'éléments LINE1 ont entre autres été observées au niveau de certains gènes dans le cancer du colon [164]. Une autre étude a démontré l'insertion de transcrits *IAP* (Intracisternal type A particle; retrovirus-like) dans le locus *Notch1* de lymphomes provenant de souris possédant un allèle hypomorphe de *DNMT1* [165]. Des événements d'hypométhylation spécifique ont aussi été observés dans plusieurs tumeurs humaines au niveau de certains oncogènes et gènes pro-métastatiques [166, 167]. Une corrélation a d'ailleurs été établie entre l'augmentation de l'expression du gène *bcl-2* (B-cell lymphoma-2), dans les cellules B de leucémie lymphocytaire chronique, ainsi que du proto-oncogène *KRAS* (Kirsten rat sarcoma), dans les carcinomes du poumon et du colon, et la réduction de leur niveau de méthylation [168, 169].

### Hyperméthylation de l'ADN

Le dernier mécanisme met en jeu l'inhibition de l'expression des gènes par l'hyperméthylation au niveau de leur promoteur. En accord avec l'hypothèse « two-hit » de Knudson [170], les deux allèles d'un gène suppresseur de tumeurs peuvent être inactivés par l'hyperméthylation, la mutation/délétion/insertion ou encore par la combinaison des deux. La perte d'expression de gènes suppresseurs de tumeurs due à l'hyperméthylation au niveau de leur promoteur a virtuellement été associée à toutes les voies de signalisation impliquées dans les cancers. Quelques exemples sont présentés dans le **Tableau III**. Le gène du *rétinoblastome* (*Rb*) a été l'un des premiers gènes suppresseurs de tumeurs dont la diminution de l'expression a été corrélée avec le niveau de méthylation de l'îlot CpG de son promoteur [171, 172]. De plus, l'inhibition par la méthylation d'un des plus importants régulateurs du cycle cellulaire, *p16* (ou *CDKN2a*; Cyclin-dependent kinase inhibitor 2a), a également été rapportée. En effet, dans la majorité des tumeurs solides étudiées, l'îlot CpG situé dans la région 5' du promoteur de *p16* est fréquemment méthylé [173, 174]. L'importance de l'hyperméthylation au niveau de promoteur est aussi bien illustrée par la capacité d'un agent démethylant, tel que la 5-aza-2'-déoxycytidine (5-aza-dC), à réactiver le gène affecté [153, 173-176].

**Tableau III.** Exemples de gènes hyperméthylés dans les cancers. Adapté de Momparler (2003) [177].

Caractéristiques	Gènes inhibés	Fonctions du gène	Références
Insensibilité aux signaux anti-prolifératifs	p16 <sup>INK4a</sup> p15 <sup>INK4b</sup>	Inhibiteurs de kinases dépendantes des cyclines; Induit l'arrêt du cycle cellulaire	[173, 174, 178] [179]
Absence de réponse aux rétinoides	RAR $\beta$	Signalisation par l'acide rétinoïque; facteur de transcription	[180]
Auto-suffisance en signaux de croissance	RASSF1A	Régulation de la voie Ras	[181]
Échappement à l'apoptose	Caspase-8 TMS-1 DAP-kinase p14ARF p73	Initie l'apoptose Pro-apoptotique Pro-apoptotique Activateur de p53; Pro-apoptotique Pro-apoptotique ?; Homologue à p53	[182] [183] [184] [175, 185] [186, 187]
Potentiel répliquatif illimité	Rb	Régulateur de transition de la phase G1/S du cycle cellulaire	[171, 172, 188]
Angiogenèse soutenue	Thrombospondin-1 VHL	Inhibiteur de l'angiogenèse	[189] [153]
Augmentation de l'invasion et de la métastasie	E-cadherin TIMP-3	Adhésion cellule-cellule; Supprime la métastasie Inhibiteur de métalloprotéases de la matrice; Inhibe la métastasie	[190, 191] [192]
Instabilité génomique	hMLH1 O <sup>6</sup> -MGMT BRCA1	Réparation des mésappariements de l'ADN Réparation des guanines alkylées Réparation des dommages à l'ADN	[176, 193, 194] [195, 196] [197-199]

RAR, retinoic acid receptor  $\beta$ ; RASSF1, RAS association domain family 1; TMS-1, target of methylation-induced silencing; DAP-kinase, death associated protein kinase; p14ARF, p14 alternate reading frame; VHL, Von Hippel-Lindau; TIMP-3, tissue inhibitor of metalloproteinase-3; O<sup>6</sup>-MGMT, O<sup>6</sup>-methylguanine-DNA methyltransferase; BRCA1, breast cancer 1.

Les mécanismes reliés à l'hyperméthylation spécifique de gènes suppresseurs de tumeurs ne sont pas encore bien définis. L'hyperméthylation de gènes suppresseurs de tumeurs pourrait, d'une part, être le reflet de l'augmentation du niveau d'activité des méthyltransférases de l'ADN dans les cellules néoplasiques. En ce sens, il a été observé à plusieurs reprises, dans différents types de cancers, une augmentation de l'activité des DNMT. En effet, une étude a démontré que sept lignées cellulaires cancéreuses sur neuf possédaient un niveau anormalement élevé d'activité méthyltransférase de l'ADN ( $>3000$  fois) par rapport aux cellules non cancéreuses [200]. Le mécanisme responsable de l'augmentation du niveau d'activité méthyltransférase de l'ADN dans les cellules cancéreuses n'est pas encore bien compris. L'augmentation de l'expression/activité des DNMT dans les cellules cancéreuses ne permet cependant pas d'expliquer la signature non-aléatoire de la méthylation de l'ADN observée dans les cellules cancéreuses [201, 202].

L'hyperméthylation spécifique pourrait être une conséquence de l'inactivation régionale de la chromatine au niveau des gènes suppresseurs de tumeurs [203]. L'inhibition serait favorisée

par l'activation de répresseurs transcriptionnels par des voies de signalisation défectueuses. Ces répresseurs pourraient par la suite recruter les HDAC, des histones méthyltransférases et les DNMT au niveau de gènes spécifiques. Il est aussi possible que l'altération de la méthylation soit causée par une aberration dans les interactions protéine-protéine entre DNMT et leurs partenaires associés, ce qui affecterait leur localisation dans la cellule, leur ciblage ou leur activité enzymatique. Il a été démontré que l'interaction de DNMT1 avec Rb inhibait son activité méthyltransférase par la rupture du complexe binaire DNMT1-ADN, suggérant que Rb pourrait moduler la méthylation durant la réPLICATION de l'ADN [204]. Comme Rb est souvent inhibé dans les cellules cancéreuses, la liaison de DNMT1 à l'ADN serait alors dérégulée et pourrait entraîner une hyperméthylation.

Une hypothèse encore controversée, mais bien intéressante, est reliée à l'idée que les cancers émergent de cellules transformées semblables aux cellules souches, ou cellules tumorales souches [205]. Selon ce modèle, les cellules souches tissus-spécifiques, ou cellules progénitrices, pourraient entreprendre une transformation cellulaire qui serait initiée par des facteurs environnementaux ou des processus endogènes comme l'inflammation chronique. Ces cellules tumorales souches possèderaient une capacité illimitée de prolifération, de même que l'habileté de se différencier et représenteraient seulement qu'une faible portion du volume total de la tumeur [205]. Il est possible d'envisager que la méthylation de l'ADN se produirait aléatoirement, et que la spécificité arriverait subséquemment par le processus de sélection. Il semble cependant que la méthylation de l'ADN ne soit pas le fruit du hasard, mais serait plutôt le reflet d'anormalités dans le programme du contrôle épigénétique, qui résulterait en des patrons de méthylation générés via un avantage sélectif [206]. Les complexes polycombs (PcG) pourraient jouer un rôle important dans la transformation cellulaire. Les complexes PcG sont d'importants répresseurs transcriptionnels en jeu dans le développement chez les mammifères, dont la surexpression corrèle avec la sévérité et la capacité d'invasion de plusieurs types de cancers [207]. Il a été rapporté que les gènes ciblés par les PcG dans les cellules embryonnaires souches étaient très peu méthylés dans les carcinomes embryonnaires, contrairement aux cellules tumorales [208]. Les auteurs de cette étude émettent d'ailleurs comme hypothèse que les carcinomes embryonnaires seraient une étape intermédiaire entre les cellules souches et les cellules tumorales. Une association spécifique entre les gènes liés par les PcG dans les cellules normales et les gènes comportant une hyperméthylation aberrante dans les cellules cancéreuses a

aussi été notée par deux autres groupes de chercheurs [209, 210]. Il est donc possible que les gènes normalement réprimés par les complexes PcG soient préférentiellement susceptibles d'acquérir une méthylation aberrante dans les cancers. Les signaux ou modifications qui induisent les DNMT à méthyler les gènes liés aux PcG restent cependant inconnus. Il est à noter que plusieurs protéines faisant partie intégrante des complexes PcG peuvent méthyler, ubiquitinier et sumoyer les histones. Elles pourraient aussi potentiellement modifier de façons post-traductionnelles les DNMT, ce qui pourrait altérer directement ou indirectement leur activité et/ou leur recrutement.

### **Application de l'épigénétique dans le diagnostic et pronostique du cancer**

Plusieurs méthodes d'identification de la signature moléculaire de différents types de cancers ont jusqu'à maintenant été établies [211, 212]. Les changements au niveau des patrons de méthylation de l'ADN pourraient potentiellement servir de biomarqueurs pour la détection et la classification des tumeurs [213, 214]. Une limitation à l'utilisation de ce type de biomarqueur dans le diagnostic du cancer réside cependant dans la distinction entre la méthylation aberrante reliée aux lésions précancéreuses et celle reliée au vieillissement [215, 216].

L'étude histologique de tissus précancéreux pour la détection de patrons de méthylation aberrants est très prometteuse dans l'évaluation des risques de développement d'un cancer. Par exemple, dans le cancer du poumon, la méthylation du gène *p16* est présente dans les lésions pré-néoplasiques des fumeurs, tandis qu'elle n'est pas détectée chez les personnes n'ayant jamais fumé. *p16* et d'autres gènes, tels que *p14*, *p15*, *E-cadherin* et *RASSF1A*, ont donc été proposés comme biomarqueurs afin d'évaluer les risques des patients de développer un cancer du poumon [217]. D'autres études effectuées dans les cancers colorectaux ont démontré l'existence d'un haut taux d'hyperméthylation aberrante dans certains cas, connus sous le nom de phénotypes positifs de méthylation d'îlots CpG (CIMP) [218, 219]. Les cancers colorectaux positifs pour des CIMP exhibent des caractéristiques génétiques et cliniques distinctes, incluant un taux élevé de mutations au niveau du gène *KRAS*, mais très peu pour *p53*. Les critères pour la définition des CIMP sont en développement pour d'autres types de cancers, mais restent encore controversés. Les récents progrès dans les techniques d'analyses de la méthylation du génome complet (méthylome) laissent envisager que le profile de méthylation des tumeurs pourrait servir à l'évaluation du risque, ainsi que dans le choix de la thérapie du cancer.

## Traitements du cancer ciblant l'épigénétique

La réversion des patrons de méthylation aberrants est une avenue thérapeutique logique et attrayante afin de traiter les cancers. En effet, les changements épigénétiques sont réversibles et, par le fait même, vraisemblablement plus facile à traiter que les mutations génétiques. Jusqu'à maintenant, les inhibiteurs de la méthylation les plus étudiés sont les analogues de nucléosides. Ces analogues exercent leur activité déméthylante par l'établissement d'un lien irréversible avec les DNMT suite à leur incorporation dans l'ADN. L'hypométhylation du génome s'établit dans les divisions cellulaires subséquentes. Ces inhibiteurs ont été utilisés pour la première fois dans des études cliniques il y a de ça plusieurs années. Des patients atteints de leucémie ont notamment été traités avec l'agent déméthylant 5-aza-dC (décitabine) dans une étude clinique [220]. Une forte toxicité cellulaire générale a cependant été observée due à l'utilisation de très fortes doses. Durant les dernières années, ces mêmes agents ont été réutilisés, mais à des doses plus faibles, et les résultats d'études cliniques indiquaient un meilleur potentiel anti-tumoral en comparaison avec de fortes doses [221]. Depuis, la FDA (Food and Drug Administration) a approuvé, en 2004, la 5-azacytidine (azacytidine) [222] et, en 2006, la 5-aza-dC [223] pour le traitement de tous les sous-types de syndromes myélodysplasiques (MDS) [224]. De bons résultats ont d'ailleurs été obtenus pour la réactivation de gènes suppresseurs de tumeurs inhibés par l'hyperméthylation de leur promoteur [225]. Le traitement de tumeurs solides avec seulement la 5-aza-dC n'a malheureusement pas été efficace pour la guérison, mais a permis de stabiliser la maladie dans certains cas [226-228]. La combinaison de doses faibles de 5-aza-dC et d'inhibiteurs d'histone désacétylase, ou d'autres agents chimiothérapeutiques, semble être une bonne alternative [229, 230]. Des agents thérapeutiques ciblant directement l'enzyme DNMT1 (zébularine, SGI-1027, MG98, etc.) ont également été développés et pourraient permettre de réduire la toxicité associée aux agents déméthylants, d'augmenter la spécificité du mécanisme d'action et ainsi que de contourner les problèmes de courtes demi-vie et de résistances développées pour certains cancers [230-232].

Une autre stratégie anti-cancer cible des protéines en lien avec l'épigénétique. UHRF1, une protéine interagissant avec l'histone méthyltransférase G9a et HDAC1 et participant à l'inhibition de gènes suppresseurs de tumeurs [233, 234], est surexprimée dans plusieurs types de cancers [235-237]. UHRF1 serait donc une bonne cible de traitement anti-cancer [238, 239]. L'inhibition partielle de UHRF1 pourrait être une stratégie à adopter, étant donné que les cellules

normales ont aussi besoin de cette protéine pour proliférer [233, 236, 240]. Certains produits naturels, tels que la thymoquinone (TQ) et les polyphénols du vin rouge, sont d'ailleurs capables d'induire l'arrêt du cycle cellulaire et l'apoptose en ciblant directement UHRF1 [241-243], offrant de nouveaux inhibiteurs très intéressants.

L'aberration des patrons épigénétiques est la plus fréquente caractéristique des tumeurs humaines, incluant l'hypométhylation globale du génome, l'hyperméthylation des îlots CpG associée à l'inhibition de la transcription et les patrons caractéristiques des modifications des histones. La compréhension de la complexité de l'épigénome ainsi que de toutes les molécules impliquées est donc d'une importance fondamentale afin de pouvoir développer des traitements contre le cancer.

## 2 La méthyltransférase de l'ADN 1

### 2.1 Introduction

La DNMT1 murine a été la première méthyltransférase de l'ADN des mammifères à avoir été clonée [75, 244, 245]. Le gène homologue humain de la DNMT1 a été identifié par Yen *et al.* (1992) et est localisé sur le chromosome 19p13.2 [246]. La DNMT1 possède un variant, DNMT1b, résultant d'un épissage alternatif, qui est aussi exprimé dans les cellules somatiques [247, 248]. Cet isoforme contient une insertion de 48 pb entre les exons 4 et 5, générant une protéine comprenant 16 acides aminés additionnels. DNMT1b est ubiquitaire et possède des propriétés enzymatiques *in vitro* comparables à DNMT1. Cependant, son niveau d'expression protéique est beaucoup plus faible que celui de DNMT1 [248] et son rôle fonctionnel *in vivo* dans les tissus somatiques demeure encore inconnu. Comme décrit précédemment, la DNMT1 est composée d'une région C-terminale conservée qui correspond au domaine catalytique, et une très grande région N-terminale comportant plusieurs domaines impliqués dans la régulation de l'enzyme (**Figure 4**).

### 2.2 Rôles

DNMT1 a une préférence pour l'ADN hémiméthylé (10 à 40 fois par rapport à l'ADN non-méthylé) [83]. De ce fait, elle est reconnue comme étant la méthyltransférase de maintenance. Toutefois, une étude suggère qu'elle possède également une activité *de novo* dans les cellules cancéreuses [249]. Afin de maintenir l'information épigénétique, les patrons de

méthylation de l'ADN doivent être reproduits après chaque cycle de réplication et c'est la DNMT1 qui assure ce processus. Le lien entre la méthylation et la réplication de l'ADN a été établi lorsqu'une interaction entre DNMT1 et PCNA, une protéine importante pour la réplication de l'ADN, a été démontrée [250]. Un modèle dans lequel l'ADN était méthylé par DNMT1 simultanément à sa synthèse a été proposé suite à la démonstration de la colocalisation de DNMT1 et des facteurs de la machinerie de réplication en phase S [251]. Des études de cinétiques ont cependant démontré, quelques années plus tard, que la vitesse de méthylation était beaucoup plus lente que celle de la réplication de l'ADN, mettant en doute ce modèle [252]. De plus, il a été démontré que la délétion du site d'interaction à PCNA de DNMT1, le domaine PBD, n'affectait pas la méthylation de l'ADN [253, 254]. Ce n'est que très récemment, suite à l'identification de UHRF1 comme partenaire de liaison à DNMT1, que le lien entre la méthylation et la réplication de l'ADN a été clarifié. En effet, UHRF1, une protéine capable de lier l'ADN hémiméthylé et de recruter DNMT1, est essentielle à la maintenance des patrons de méthylation [124, 125]. Enfin, il semble que DNMT1 soit dirigée aux sites de l'ADN hémiméthylés principalement par UHRF1, et que l'interaction entre DNMT1 et PCNA soit hautement transitoire, n'augmentant que de deux fois l'efficacité de la méthylation post-réplicative [254]. Le rôle majeur de l'interaction avec PCNA servirait plutôt à enrichir la concentration locale en DNMT1, pour ainsi augmenter l'efficacité de la méthylation aux sites de réplication.

DNMT1 est localisée dans le noyau des cellules tout au long de la phase S. Suite à la fertilisation, elle est cependant activement exclue du noyau des embryons et est emmagasinée dans le cytoplasme [255]. Ceci conduit au phénomène de déméthylation passive du génome femelle observé durant la pré-implantation de l'embryon. Durant cette même étape du développement, on observe la relocalisation nucléaire d'un autre isoforme de DNMT1, soit DNMT1o. Cet isoforme, issus d'un épissage alternatif dirigé par un exon spécifique, se distingue par le fait qu'il lui manque les 118 premiers acides aminés, lui offrant une plus grande stabilité *in vivo* [256]. Cette caractéristique permet d'ailleurs son accumulation à de très hauts niveaux dans les ovocytes quiescents. DNMT1o est donc présente durant l'ovogenèse, ce qui suggère un rôle fonctionnel dans l'établissement des empreintes génomiques [255, 257]. Ceci est conséquent avec une étude démontrant le faible taux de survie durant le dernier tiers de la gestation de fœtus hétérozygotes provenant de femelles homozygotes pour la délétion spécifique de l'exon maternel

de DNMT1 [87]. L'expression d'un autre isoforme de DNMT1, DNMTp, a d'abord été détectée durant la phase pachytène des spermatocytes [257, 258], puis dans les muscles squelettiques au niveau des myotubes spécifiquement différenciés [259]. DNMT1p semblerait jouer un rôle important dans la gamétogenèse, tout comme DNMT1o, mais peut-être également dans la myogenèse.

Outre sa fonction dans le développement et dans la maintenance des patrons de méthylation durant la réPLICATION de l'ADN, la DNMT1 possède un rôle de régulateur transcriptionnel. Bien que la distribution de cette protéine est diffuse dans la cellule (nucléocytoplasmique) en phase G1 et G2 du cycle cellulaire, on la retrouve quand même associée à la chromatine en dehors de la phase S [260]. Il a d'ailleurs été démontré que DNMT1 servait de co-répresseur pour certains facteurs de transcription, tels que p53 [261] et Daxx [262]. DNMT1 est aussi recrutée par la protéine HP1 au niveau de l'hétérochromatine, ce qui suggère un rôle dans le maintien de cet état chromatique [263]. Ce rôle de DNMT1 sera abordé un peu plus en détail dans une section ultérieure de la thèse.

Il est maintenant bien établi que la DNMT1 est essentielle dans le développement embryonnaire des mammifères. La délétion homozygote de DNMT1 chez la souris cause une hypométhylation significative de plusieurs gènes reliés à l'épigénétique, affectant entre autre les empreintes génomiques [86], l'inactivation du chromosome X [264] et la suppression des éléments transposables [265]. Les cellules ES murines possédant une délétion homozygote de DNMT1 sont viables avec une morphologie normale, mais montrent une réduction de 70% du niveau de cytosines méthylées par rapport aux cellules de type sauvage [86]. Par contre, une délétion conditionnelle homozygote de DNMT1 ou son inactivation par ARN interférants dans des cellules somatiques cause, en plus d'une hypométhylation du génome, la mort cellulaire par apoptose dans les jours suivants [253, 266, 267]. Ceci suggère que la méthylation *de novo*, catalysée principalement par DNMT3a et 3b, est suffisante pour assurer la survie des cellules ES, tandis que la survie des cellules différenciées requièrent que les patrons de méthylation soient maintenus par DNMT1.

## 2.3 Régulation

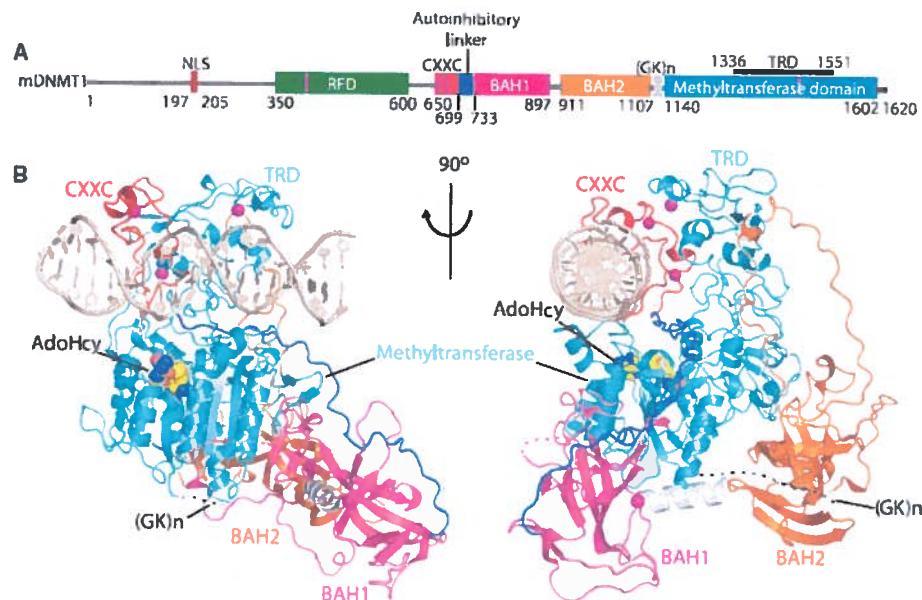
Étant donné le rôle central de la méthylation de l'ADN dans le contrôle épigénétique de l'expression des gènes et son implication dans différentes maladies, l'activité et l'expression de

DNMT1 se doivent d'être bien contrôlées. Nous avons vu précédemment que le recrutement de DNMT1 au niveau des foyers de réPLICATION de l'ADN est régulé principalement par les protéines UHRF1 et PCNA. C'est d'ailleurs lors de la réPLICATION cellulaire, en phase S, que le niveau d'expression de DNMT1 est au plus haut alors qu'on le retrouve à son minimum dans les cellules quiescentes (G0) [268, 269]. De façon intéressante, DNMT1 est également associée à l'hétérochromatine péricentromérique à partir de la phase S tardive jusqu'en phases M et G1 précoce. DNMT1 est une protéine finement régulée, et ce, à plusieurs niveaux.

### 2.3.1 Régulation allostérique

DNMT1 possède deux sites de liaison à l'ADN dans le domaine N-terminal et un seul dans le domaine C-terminal [270, 271]. Le premier site de liaison en N-terminal se situe dans la région 261-356 acides aminés et le second dans le domaine ZnF (580-697). Il semble que les deux sites soient indépendants; le premier jouant un rôle dans l'activation de DNMT1 par un substrat complètement méthylé, et le second, dans son inhibition en présence de fortes concentrations de substrats [272]. Tout récemment, une étude a solutionné de façon partielle la structure cristallographique de la DNMT1 humaine (acides aminés 646-1600) en complexe avec un duplexe d'ADN de 19pb et le S-adenosyl-homocystéine (résolution de 3,6 Å) [273] (**Figure 6**). Cette étude complémente les résultats de structure obtenus pour le domaine de ciblage au foyer de réPLICATION (TS) (acides aminés 350-618, code PDB : 3epz) de la DNMT1 humaine [274]. Elle confirme également que la DNMT1 est composée de multiples sous-domaines interconnectés par des boucles de régulation flexibles, facilitant les interactions protéine-protéine, la phosphorylation ou les changements de structures dynamiques qui contrôlent l'activité de l'enzyme [275-277]. De plus, la boucle formant les domaines BAH1 et BAH2 pénètre dans le domaine catalytique, expliquant probablement le fait que le domaine catalytique seul est inactif [270, 272]. Il apparait que le premier domaine à lier l'ADN est le domaine ZnF. Cette interaction dépendrait de la présence d'ADN méthylé. En présence de sites hémiméthylés, le domaine ZnF ne lierait pas l'ADN, et le site actif serait ouvert, laissant la possibilité à l'enzyme de lier l'ADN et d'effectuer la méthylation de maintenance. En présence d'un substrat non-méthylé, le domaine ZnF lierait le site CpG non-méthylé et bloquerait ainsi la liaison à l'ADN au site actif. Cette structure inhibitrice semble cependant instable et dynamique puisque DNMT1 est active en présence d'un substrat non-méthylé. Enfin, deux autres groupes ont démontré que le domaine TS

(ou RFTS, Replication focus targeting sequence) inhibe la capacité de liaison de DNMT1 à l'ADN, et que cette inhibition pourrait être relevée par la liaison d'un activateur tel que UHRF1 [278, 279]. La structure très dynamique de DNMT1 rend l'interprétation des résultats émanant des études de son activité enzymatique bien complexe. Une meilleure compréhension de la régulation allostérique pourra certainement aider à mieux interpréter l'activité de DNMT1 dans la cellule et les multiples facettes de sa régulation.



**Figure 6.** Vue d'ensemble d'un complexe entre la mDNMT1(650-1602) et un oligomère d'ADN de 19 nucléotides lié à l'AdoHcy. A) Architecture des domaines et présentation de la séquence de la mDMNT1. B) Représentation figurée du complexe en deux vues orthogonales. Les domaines CXXC, BAH1, BAH2 et méthyltransférase sont colorés en rouge, rose, orange et bleu pâle respectivement. L'ADN et les ions de zinc sont représentés en beige et en mauve respectivement; le lien entre les domaines CXXC et BAH1 est en bleu foncé, le lien entre BAH1 et BAH2 est en argent, celui entre BAH2 et le domaine méthyltransférase contenant les répétitions (GK)<sub>n</sub> est en noir et l'AdoHcy lié est représenté en un modèle moléculaire en trois-dimension. mDNMT1, DNMT1 murine; AdoHcy, S-Adenosyl-L-homocysteine. Adapté de Song *et al.* 2011 [273].

### 2.3.2 Régulation transcriptionnelle et post-transcriptionnelle

La transcription est une étape précoce de l'expression des gènes et elle est finement régulée chez les mammifères. *DNMT1* montre une expression spécifique suivant le cycle cellulaire. Il a tout d'abord été démontré que l'activation transcriptionnelle de *DNMT1* était ciblée au niveau de quatre régions dans son promoteur/enhancer comportant plusieurs sites de liaison AP-1 (Activator protein-1) et E2F [280]. Ces multiples sites AP-1 expliquerait au niveau moléculaire la forte réponse de *DNMT1* à l'induction de la voie Ras-AP-1 chez la souris [281, 282], les cellules humaines [283] et durant la tumorigenèse [284]. Plusieurs années plus tard, une équipe démontrait non seulement l'activation transcriptionnelle de *DNMT1* par E2F, mais aussi

l'inhibition de cette activation par la protéine Rb [300]. De façon similaire, l'expression de *DNMT1* est augmentée par p300 et cette activation est inhibée par p21<sup>WAF1</sup> [285]. L'expression de *DNMT1* est aussi régulée par p53. En effet, p53 réprime la transcription de *DNMT1*, tandis que le facteur de transcription Sp1 empêche cette répression [286]. Il est même suggéré que la balance entre p53 et Sp1 déterminerait le statut de transcription de *DNMT1* [287]. p53 joue un rôle important dans l'arrêt du cycle cellulaire en phase G<sub>1</sub>/S en réponse à divers stress cellulaires, tel que le dommage à l'ADN. En ce sens, il pourrait être nécessaire de bloquer la réPLICATION de l'ADN, ainsi que les processus auxiliaires, comme la méthylation de l'ADN. Par ailleurs, la transcription de *DNMT1* est aussi régulée par le récepteur nucléaire ERR $\gamma$  (Estrogen related receptor  $\gamma$ ), qui induit son expression suite à la liaison directe des éléments de réponse (ERE1/ERE2; estrogen response element) localisés dans le promoteur de *DNMT1*, et cette transactivation est inhibée par SHP (Small heterodimer partner) [288].

Plusieurs études ont démontré une régulation transcriptionnelle de *DNMT1* dans diverses cellules cancéreuses. Ainsi, l'IL-6 (Interleukine 6) régulerait à la hausse l'expression de *DNMT1* via le facteur de transcription Fli-1 (Friend leukemia integration 1) dans des cellules érythroleucémiques humaines [289], reliant pour la première fois les cytokines inflammatoires et la méthylation de l'ADN. Une autre équipe a aussi démontré que *DNMT1* serait régulée par la voie de signalisation APC (Adenomatous polyposis coli), puisque des mutations dans le gène *APC* résultent en l'augmentation du niveau d'ARNm de *DNMT1* dans les cellules cancéreuses colorectales humaines HT-29 [290]. De plus, le gène suppresseur de tumeurs *BRCA1* (Breast Cancer 1), fréquemment muté dans le cancer du sein, active la transcription de *DNMT1* par la liaison d'un site OCT1 (Organic cation transporter 1) [291]. Une déficience en *BRCA1* est d'ailleurs associée à la diminution de l'expression de *DNMT1* et une hypométhylation globale du génome. Il a aussi été démontré que l'inhibition de la voie ERK/MAPK (Extracellular signal-regulated kinases/Mitogen-activated protein kinases) cause une diminution du niveau de méthylation de l'ADN dans les cellules de cancer du colon via la réduction de l'expression de *DNMT1* [292], suggérant que cette voie de signalisation est impliquée dans la régulation transcriptionnelle de la *DNMT1*. Enfin, il a été démontré que STAT3 (Signal transducer and activator of transcription 3), un facteur de transcription reconnu pour être constitutivement activé dans plusieurs cancers, induit l'expression de *DNMT1* dans les lymphocytes T malins [293].

Par ailleurs, *DNMT1* est également régulé au niveau post-transcriptionnel par la protéine AUF1 (AU-rich element/poly(U)-binding/degradation factor 1). AUF1 interagit au niveau de la région 3' non-codante de l'ARNm de *DNMT1* et le cible pour la déstabilisation par l'exosome [294]. L'inhibition de AUF1, qui est lui-même régulé de manière spécifique au cycle cellulaire, conduit d'ailleurs à l'augmentation de l'expression de *DNMT1*, ainsi qu'à l'augmentation de l'activité méthyltransférase de l'ADN et de l'hyperméthylation du génome. L'ARNm de *DNMT1* est également régulé directement par des miARN, notamment miR-148a, miR-152, miR-126, et plus récemment, miR-342 [295-297]. En effet, suite à l'induction par IL-6 des cellules cholangiosarcomes humaines, on observe une réduction de l'expression protéique de *DNMT1*, et ceci par la modulation à la hausse de miR-148a et miR-152 [295]. En conséquence, on observe une déméthylation du génome et une augmentation de l'expression de plusieurs gènes suppresseurs de tumeurs. De plus, miR-148a, ainsi que miR-126, régulent à la baisse l'expression de *DNMT1* dans les cellules T CD4<sup>+</sup> humaines de patients atteints de Lupus [296]. Dans les cellules de cancer colorectal (CRC; colorectal cancer), c'est plutôt la surexpression de miR-342 qui induit l'inhibition de *DNMT1* et la réexpression de plusieurs gènes, dont *RASSF1A* (RAS association domain family 1A), via la déméthylation de leur promoteur [297].

### 2.3.3 Interactions protéine-protéine

Le domaine N-terminal de *DNMT1* est connu pour interagir avec une grande quantité de protéines (**Tableau IV**). *DNMT1* interagit, par exemple, avec PCNA, permettant son recrutement au niveau des foyers de réPLICATION lors de la phase S via le domaine PBD (acides aminés 163-174). Récemment, il a été démontré que *DNMT1* est rapidement recrutée au niveau des bris double-brins de l'ADN (DSB) via son domaine PBD, et ce, de façon transitoire [298]. Le recrutement de *DNMT1* dépend principalement d'ATR (Ataxia telangiectasia and Rad3-related protein), PCNA, ainsi que CHK1 et RAD9 (complexe 9-1-1), deux autres protéines qui interagissent directement avec *DNMT1* [298, 299], démontrant un lien entre *DNMT1* et la réponse aux dommages à l'ADN. *DNMT1* interagit également avec UHRF1 pendant les phases S et G2/M via le domaine TS (acides aminés 331-550). La liaison de *DNMT1* au niveau de l'hétérochromatine répliquée tardivement en phase S représente probablement un mécanisme assurant la maintenance complète de la méthylation dans ces régions génomiques, ou encore, suggère un rôle pour *DNMT1* dans la répression transcriptionnelle de la chromatine [260].

**Tableau IV.** Résumé des protéines interagissant physiquement ou fonctionnellement avec DNMT1. Adapté de Svedruzic (2011) [275].

Complexe de réPLICATION de la chromatine	RéPARATION de l'ADN, contrôLE du cycle cellulaire et régULATION de l'apoptose	Méthylation dirigée par les ARN
- DNMT3a et DNMT3b [99]	- PARP-1 [300, 301]	- MeCP2 [302, 303]
- SNF2h/NoRC (complexe de remodelage de la chromatine) [304]	- pRb/E2F1 (contrôle la transition G1/S et la phase S du cycle cellulaire) [204, 268]	- RNA-Pol II [305-307]
- LSH (protéine reliée à la famille de remodelage de la chromatine SNF2) [308]	- p53 (régulation du cycle cellulaire et de l'apoptose) [261]	- ARNt et ARNm spécifiques [309, 310]
- PCNA [311]	- DMAP1 [312-314]	
- UHRF1 [124, 125]	- RGS6 (membre des protéines RGS des mammifères) [313]	
- HP1β (protéine à chromodomaine) [96, 263]	- CK1δ/ε (protéine sérine/thréonine kinase) [315]	
- SUV39H1 (histone lysine N-méthyltransférase) [96]	- Annexin V (protéine d'échafaudage qui permet l'ancrage de d'autres protéines à la membrane cellulaire et participe dans l'apoptose) [316]	
- G9a (histone méthyltransférase) [317]	- Hsp90 (chaperonne) [318]	
- HDAC1 et HDAC2 [268, 312]	- p23 (chaperonne) [319]	
- PML-RAR (facteur de transcription oncogène) [95]	- SET7 (protéine lysine méthyltransférase) [320]	
- RIP140 (ou NRIP1; répresseur métabolique) [321]	- AKT1 (protéine sérine/thréonine kinase) [322]	
- CFP1 (domaine PHD) [323]	- Chk1 (réponse aux dommages à l'ADN) [299]	
- MBD2/MBD3 [269]	- RAD9 (complexe 9-1-1; réponse aux dommages à l'ADN) [298]	
- Pcg-Ezh2 [324]		

NoRC, nucleolar remodelling complex; LSH, lymphoid-specific helicase; PCNA, proliferating cell nuclear antigen; UHRF1, ubiquitin-like with PHD and ring-finger domains 1; HP1β, heterochromatin protein 1β; HDAC1/2, histone deacetylase 1/2; PML-RAR, promyelocytic leukemia-retinoic acid receptor; NRIP1, nuclear receptor interacting protein 1; CFP1, CXXC finger protein 1; MBD2/3, methyl-binding domain; Pcg-Ezh2, polycomb group-enhancer of zeste homolog 2; PARP-1, poly(ADP-ribose) polymerase 1; pRb/E2F1, protein Retinoblastoma/E2F1; DMAP1, DNA methyltransferase 1-associated protein 1; RGS6, regulator of G-protein signalling; CK1δ/ε, casein kinase 1δ/ε; Hsp90, heat shock protein 90; MeCP2, methyl CpG binding protein 2; SUV39H1, Su(var)3-9 homolog 1..

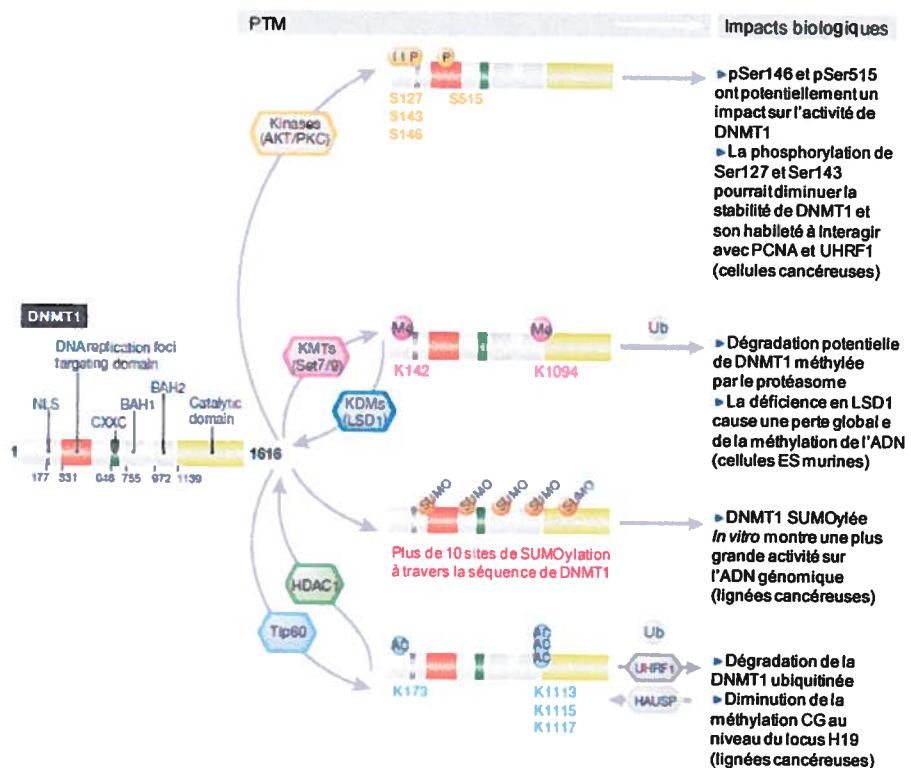
Dans un contexte de répresseur transcriptionnel, il a été démontré que la région N-terminale de DNMT1 interagissait avec diverses protéines associées à la chromatine, dont Rb, DMAP1 (DNMT1-associated protein 1), HDAC1/2, MeCP2, SUV39H1 (Su(var)3-9 homolog 1), HP1β ainsi que le complexe de remodelage de la chromatine nucléolaire, Tip5/Snf2h (Transcription termination factor I-interacting protein 5/Sucrose non-fermentable 2 human) [96, 268, 303, 312, 325-327]. Ces nombreuses interactions suggèrent qu'il existe différents mécanismes indépendants par lesquels DNMT1 agirait comme répresseur transcriptionnel. Premièrement, DNMT1 interagit avec la protéine Rb, important suppresseur de tumeurs et régulateur du cycle cellulaire, qui inhibe la transcription via le recrutement de HDAC1 [204,

268]. Le complexe DNMT1-Rb s'associe également avec le facteur de transcription E2F1, induisant une répression transcriptionnelle des promoteurs possédant des éléments de réponse à E2F1 [268]. Il a aussi été démontré que DNMT1 établissait une répression transcriptionnelle par interaction directe avec les protéines DMAP1 et HDAC2 [312]. DMAP1 possède une activité intrinsèque d'inhibiteur et interagit avec le co-répresseur transcriptionnel TSG101 (Tumor susceptibility gene 101) et le co-régulateur transcriptionnel Daxx [328]. À la différence de DMAP1, qui s'associe avec DNMT1 tout au long de la phase S, l'interaction entre HDAC2 et DNMT1 se produit spécifiquement au niveau des foyers de réPLICATION en phase S tardive. Il a d'ailleurs été proposé que DNMT1 module le recrutement de HDAC à l'hétérochromatine péricentromérique, permettant la désacétylation des histones s'assemblant à l'ADN nouvellement répliqué [312]. De plus, DNMT1 interagit directement avec les protéines de liaison aux groupements méthyles, telles que MBD2, MBD3 et MeCP2 [269, 303]. La liaison de DNMT1 à MeCP2 pourrait également contribuer à la reconnaissance de l'ADN hémiméthylé et jouerait un rôle dans la méthylation de maintenance. Enfin, DNMT1 interagit avec l'histone méthyltransférase SUV39H1 et la protéine de l'hétérochromatine HP1 $\beta$  afin de maintenir l'état répressif de la chromatine [96]. HP1 fonctionne comme un répresseur transcriptionnel par la reconnaissance de la méthylation H3K9 et l'inhibition de la transcription par son association à DNMT1 se fait de façon indépendante de l'activité méthyltransférase de maintenance de cette dernière [263]. Les fonctions combinées de HP1, G9a et DNMT1 sont également requises pour la répression du gène *survivin* [263, 317]. Il a aussi été démontré que UHRF1 facilitait l'accumulation de HDAC1, DNMT1 et G9a afin d'inhiber la transcription du gène suppresseur de tumeurs *p21* [234]. UHRF1 et DNMT1 seraient donc impliqués dans l'organisation de l'état répressif de la chromatine par la coopération avec d'autres facteurs associés à l'hétérochromatine, tels que G9a et HDAC.

Quelques interactions protéiques avec le domaine C-terminal de DNMT1 ont également été décrites. En effet, la chaperonne p23 et la protéine suppresseur de tumeurs p53 interagissent avec la portion catalytique de DNMT1 [261, 319]. L'interaction entre DNMT1 et p53 semble être essentielle pour la régulation du gène *survivin* par la stabilisation du complexe HDAC1/DNMT1/p53 sur son promoteur, menant à l'hyperméthylation des sites CpG [261]. Par contre, le rôle de l'interaction entre p23 et DNMT1 n'est pas encore bien compris.

### 2.3.4 Modifications post-traductionnelles

Il est bien connu que les protéines subissent d'abondantes modifications covalentes pendant et après leur synthèse. Celles-ci vont de la simple protéolyse contrôlée à l'ajout covalent d'énormes groupements. Ces modifications peuvent servir, entre autres, à réguler l'activité des protéines, à les étiqueter afin qu'elles soient reconnues par des partenaires métaboliques ou par des systèmes de dégradation, de même que permettre leur ancrage dans la membrane ou moduler leur localisation cellulaire et activer des cascades de signalisation. Depuis longtemps, les modifications post-traductionnelles des histones sont associées à la régulation de l'expression des gènes. Des études récentes suggèrent que les méthyltransférases de l'ADN, notamment DNMT1, sont aussi modifiées de façon post-traductionnelle. En effet, la DNMT1 peut être modifiée de plusieurs façon, soit par la sumoylation [329], la méthylation [320], la phosphorylation [330], l'ubiquitination et l'acétylation [331, 332] (**Figure 7**).



**Figure 7.** Régulation post-traductionnelle de DNMT1. Un sommaire des modifications covalentes post-traductionnelles de la protéine DNMT1 mettant en lumière leur signification biologique dans des contextes physiologiques. Ces modifications incluent la phosphorylation (P), la méthylation (Me), la sumoylation (SUMO), l'acétylation (Ac) et l'ubiquitination (Ub). Les enzymes effectuant ces PTM sont indiquées. DNMT1, DNA methyltransferase 1 ; ES : cellule souche embryonnaire ; HDAC, histone deacetylase; KDM, lysine demethylase; KMT, lysine methyltransferase; LSD1, lysine-specific demethylase 1; PCNA, proliferating cell nuclear antigen; PTM, post-translational modifications; SUMO, small ubiquitin-like modifier; UHRF1, ubiquitin-like PHD and RING finger domains 1; HAUSP, herpes virus-associated ubiquitin specific protease. Adapté de Denis *et al.* (2011) [333].

La sumoylation est connue pour stabiliser les protéines et les protéger contre la dégradation, de même que pour moduler la localisation cellulaire, les interactions protéine-protéine et la liaison à l'ADN. En plus de l'ATP, la réaction de sumoylation requiert la présence de deux enzymes, l'enzyme d'activation E1 et l'enzyme de conjugaison E2. Il a été démontré que DNMT1 interagissait avec SUMO-1 et Ubc9 (Ubiquitin carrier protein 1), un membre de la famille E2, et devenait sumoylée sur plusieurs résidus lysines. La sumoylation de DNMT1 augmente sa liaison à l'ADN et, possiblement, son activité méthyltransférase [329].

La méthylation de DNMT1 par la SET7, une lysine méthyltransférase d'histones, cible la lysine 142 principalement durant la phase S tardive du cycle cellulaire [320]. Il a été démontré que lorsque DNMT1 était méthylée sur ce résidu, elle devenait moins stable et était ciblée pour la dégradation subséquente via l'ubiquitine-protéasome [320]. LSD1 (Lysine-specific demethylase 1) pourrait jouer le rôle d'antagoniste à SET7 et possiblement stabiliser DNMT1 par la déméthylation de la lysine 142. Il a d'ailleurs été démontré que la perte de LSD1 accélérerait la dégradation de DNMT1, résultant en l'augmentation de l'hypométhylation du génome, ce qui corrèle avec cette hypothèse [334].

Tout récemment, un nouveau complexe multiprotéique comprenant DNMT1, UHRF1, Tip60 (HIV-tat interacting protein) et HAUSP (Herpes virus-associated ubiquitin specific protease) a été identifié [331, 332]. Ce complexe régulerait très finement DNMT1. Certains résultats supportent également l'idée que le duplexe UHRF1/DNMT1 se déplacerait sur l'ADN en progression avec le processus de réplication, et que ce complexe macromoléculaire aurait la capacité de s'autoréguler [335]. En effet, le groupe de Du *et al.* [331] évoque la possibilité que la stabilité de DNMT1 soit régulée de façon coordonnée via un processus dépendant de UHRF1 et HAUSP. Le modèle proposé suggère que Tip60 et UHRF1 agiraient négativement sur DNMT1, tandis que HAUSP et HDAC1 agiraient en protecteurs. Plus précisément, Tip60 acétylerait DNMT1, favorisant son ubiquitination par UHRF1 et sa dégradation subséquente. De leur côté, la désacétylation et la déubiquitination par HDAC1 et HAUSP respectivement, stabiliseraient DNMT1. D'ailleurs, en absence de HAUSP, une hypométhylation de l'ADN est observée au niveau du locus de l'empreinte génomique H19 spécifiquement [331]. Les changements au niveau de la balance des composantes de ce complexe macromoléculaire lors du cycle cellulaire dicteraient le devenir de DNMT1. En phase S, quand DNMT1 est requise pour la méthylation du nouveau brin synthétisé, HAUSP surpasserait l'activité ubiquitine ligase de UHRF1 [331].

Suivant la progression de la phase S, HAUSP serait déplacé du complexe et DNMT1 deviendrait alors acétylée par l'action de Tip60 [331]. Les signaux induisant ces changements proviendraient probablement de l'environnement où la machinerie de réPLICATION se trouve, cependant le mécanisme n'est pas encore bien compris.

## 2.4 La phosphorylation de DNMT1 par les sérine/thréonine kinases

### Les sites de phosphorylation identifiés dans la littérature

Il est de plus en plus évident que la DNMT1 est modulée par différentes modifications post-traductionnelles, dont la phosphorylation de résidus sérines et thréonines. Durant la dernière décennie, des techniques de spectrométrie de masse à large échelle ont été utilisées afin d'étudier le phosphoprotéome cellulaire. De ces études, plusieurs sites de phosphorylation de l'enzyme DNMT1 ont été observés [336-344]. C'est en 1997, par l'équipe de Glickman *et al.* [330], que le premier site de phosphorylation de la DNMT1 murine a été identifié. Effectivement, la Ser515 a été identifiée comme le site majeur de phosphorylation dans les cellules érythroleucémiques murines. La phosphorylation de son homologue chez l'humain, la Ser514, n'a cependant pas encore été démontrée dans les types cellulaires étudiés jusqu'à maintenant. Il est possible que la phosphorylation de la Ser514 soit spécifique aux cellules érythroleucémiques, mais cela reste encore à être démontré. Il a été montré par la suite que la Ser515 était importante pour l'activité catalytique de l'enzyme murine, puisque sa mutation en alanine abolissait son activité méthyltransférase de l'ADN *in vitro* [345]. Cette étude suggère également que la phosphorylation de ce résidu serait importante pour l'interaction du domaine N-terminal avec le domaine catalytique, nécessaire pour son activité.

La plupart des sites de phosphorylation identifiés sur la DNMT1 humaine se retrouvent au niveau des résidus sérines et thréonines localisés dans le domaine N-terminal de l'enzyme (**Figure 8**). Seulement trois résidus tyrosines de la DNMT1 humaine, Tyr359, Tyr399 et Tyr969, ont été démontrés comme étant phosphorylés [346-348], comparé à une vingtaine de sérines et de thréonines [336-344]. Dans les cellules HEK293, il semble que les Ser714 et Ser154 soient les sites majeurs de phosphorylation [341, 342], tandis qu'il semble que ce soit plutôt les Ser127, Ser714 et Ser143 dans les lymphomes T (cellules Jurkat) [343], et les Ser141 et Ser714 dans les lymphocytes B et les myélomes multiples [346, 349, 350]. Le plus grand nombre d'études rapportant la phosphorylation de DNMT1 sur une multitude de sites ont été effectuées dans les cellules HeLa [336-340, 351]. De ces sites, la phosphorylation des Ser127, Ser152, Ser154, S714,

Ser954 et Ser1105 a été observée par plusieurs groupes différents; la Ser714 étant la plus fréquemment identifiée [336-338, 340, 342, 343, 346, 349-352], et ce, même dans les cellules souches embryonnaires humaines [353, 354]. De façon intéressante, une étude récente analysant la dynamique de phosphorylation suivant la différentiation de cellules embryonnaires souches humaines induite par le PMA ou par un milieu non-conditionné (NCM), a permis l'identification de sites de phosphorylation de la DNMT1 [355]. En effet, plusieurs sites de phosphorylation de DNMT1 observés auparavant dans la littérature, dont les Ser141, Ser143 et Ser154, mais aussi la Ser591 nouvellement identifiées, sont modulés par la différentiation induite par le PMA. De plus, les Ser133 et Ser189 sont modulées suite à la différentiation par un NCM, tandis que les Ser127, Ser714, Ser1105 et Ser1204 ne montrent aucun changement dans leur niveau de phosphorylation suivant la période de différentiation [355]. Par ailleurs, la base de données de modifications post-traductionnelles Phosida (<http://www.phosida.com>) permet d'obtenir des détails supplémentaires sur ces sites de phosphorylation. En effet, selon la structure protéique prédictive de la DNMT1, les Ser127, Ser152, Ser154 et Ser714 seraient des sites hautement accessibles, contrairement à la Ser1105 qui le serait que très peu. Les Ser152, Ser154, Ser714 et Ser1105 sont également très conservées dans l'évolution, tandis que la Ser127 ne l'est pas. La phosphorylation de ces résidus pourrait donc être importante pour différents aspects de la régulation de DNMT1, par exemples dans le contrôle de son activité enzymatique ou encore des interactions protéiques. Cependant, encore très peu d'études ont été effectuées à ce propos ou dans le but d'identifier les sérine/thréonine kinases responsables de la phosphorylation de ces sites.

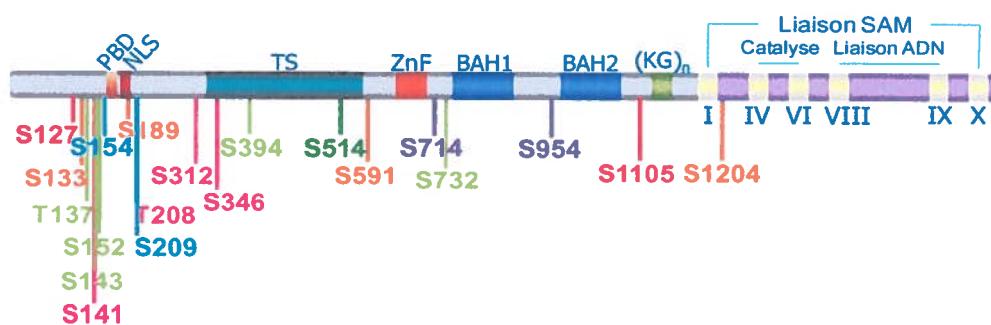


Figure 8. Schématisation des sites de phosphorylation de la DNMT1 humaine identifiés dans la littérature.

### Les protéines kinases associées à la phosphorylation de DNMT1

Jusqu'à maintenant, quelques études seulement ont identifié des kinases associées, directement ou non, à la phosphorylation de la DNMT1 humaine. Tout d'abord, il a été démontré que la voie PKB/Akt stabilisait la protéine DNMT1, permettant ainsi la maintenance de la

méthylation de l'ADN [356]. Toutefois, cette étude ne démontrait pas la phosphorylation de DNMT1, mais plutôt l'augmentation de son ubiquitination à la suite de l'inhibition de la voie PKB/Akt. Presqu'en même temps, une autre étude démontrait cette fois-ci la phosphorylation de DNMT1 par Akt suivant la stimulation à l'IL-6 [357]. En fait, ce groupe a observé une augmentation de la translocation de DNMT1 au noyau suivant la phosphorylation par Akt d'un résidu situé près du NLS. Bien que la phosphorylation de la Ser209 ait été observée, aucune interaction entre DNMT1 et Akt n'a été démontrée dans cette étude. Ce n'est que plus récemment qu'une interaction et colocalisation entre DNMT1 et Akt ont été démontrées [322]. En effet, Akt1 interagit avec DNMT1 et la phosphoryle sur la Ser143, augmentant sa stabilité. Cet effet est inversé lorsque la DNMT1 est méthylée sur la Lys142 par la SET7, deux modifications mutuellement exclusives. Enfin, une dernière étude a identifié non seulement la Ser143, mais aussi la Ser127, comme cible de phosphorylation par Akt [358]. La Ser127 semble également être phosphorylée par les PKC, impliquant ces kinases pour la première fois dans la phosphorylation de DNMT1. De façon intéressante, la phosphorylation de ces deux résidus de DNMT1 dans les gliomes humains et murins, par Akt et PKC, inhibe l'interaction entre DNMT1, PCNA et UHRF1, induisant une hypométhylation du génome et une instabilité chromosomique [358]. Ce groupe associe d'ailleurs l'état de la phosphorylation des résidus Ser143 et Ser127 au mauvais pronostique des gliomes et suggère leur utilisation prometteuse comme biomarqueurs, pour la détection précoce des glioblastomes multiformes. Enfin, l'implication des PKC dans la phosphorylation de DNMT1 est également supportée par une étude démontrant l'induction rapide de la déméthylation du promoteur de la *reelin* dans les tissus de l'hippocampe de la souris suivant l'activation des PKC par un ester de phorbol [359].

Chez la souris, DNMT1 a été démontrée comme étant phosphorylée par la CDKL5 (Cyclin-dependent-kinase-like 5) [360] et la CK1 $\delta/\epsilon$  [315]. Bien que la phosphorylation de DNMT1 par CDKL5 soit faible et son rôle encore incertain, la phosphorylation de DNMT1 par CK1 $\delta/\epsilon$  cible principalement la Ser146 et réduit sa capacité de liaison à l'ADN. La sérine 146 n'est cependant pas conservée chez l'humain.

### 3 Les protéines kinases

#### 3.1 Introduction

La phosphorylation de protéines réfère à la capacité de certaines protéines kinases à catalyser le transfert d'un groupe phosphate de l'ATP sur l'hydroxyle (groupe -OH) des chaînes latérales des acides aminés. Cette réaction est réversible par l'action des phosphatases, qui enlèvent le groupe phosphate de protéines cibles. Plus de 30% des protéines humaines sont modifiées par la phosphorylation. Le génome humain comporte environ 518 protéines kinases, dont les gènes constituent environ 1,7% des gènes totaux [361]. La phosphorylation peut avoir divers effets sur les protéines ciblées, comme la modification de l'activité protéique, la modulation de la localisation cellulaire ou encore des associations protéine-protéine. Elle peut aussi contrôler d'autres processus cellulaires, incluant la progression du cycle cellulaire, le métabolisme, la transcription, le réarrangement et le mouvement du cytosquelette, l'apoptose et la différentiation [361]. La phosphorylation joue également un rôle critique dans la communication intercellulaire durant le développement, dans les réponses physiologiques et l'homéostasie, ainsi que dans le fonctionnement des systèmes nerveux et immunitaire. Les protéines kinases sont donc reconnues comme étant les régulatrices des voies de signalisations cellulaires, notamment celles impliquées dans la transduction des signaux. Par conséquent, leur activité n'est habituellement pas constitutive, mais très finement régulée. Les kinases sont aussi impliquées dans plusieurs maladies humaines [362]. Conséquemment, plusieurs inhibiteurs ont été développés pour le traitement de différentes maladies, dont le cancer [363].

Il existe trois grandes catégories de kinases : celles qui phosphorylent les séries et thréonines, celles qui phosphorylent les tyrosines et celles qui phosphorylent ces trois types de résidus [364]. Comme la DNMT1 est phosphorylée principalement sur des résidus séries et thréonines, le présent chapitre discutera du groupe des sérine/thréonine kinases.

### 3.2 Les sérine/thréonine kinases

Les sérine/thréonine kinases composent près de 385 des 518 protéines kinases chez l'humain [361]. Bien que les sérine/thréonine kinases phosphorylent toutes des résidus séries ou thréonines de leurs substrats, ceux-ci sont spécifiquement phosphorylés selon la séquence en acides aminés qui entoure le résidu phosphorylé que l'on appelle *séquence consensus* [365]. Les kinases ne sont habituellement pas spécifiques qu'à un seul substrat, puisque les résidus du site consensus du substrat établissent des contacts avec plusieurs acides aminés situés au niveau du site catalytique de l'enzyme [366]. Par contre, elles phosphorylent souvent une famille de

substrats possédant des séquences de reconnaissance communes. Le domaine catalytique des kinases phosphorylant des substrats faisant habituellement parti d'un même groupe est hautement conservé tandis que le domaine de régulation permettant la reconnaissance de substrats différents est beaucoup plus variable. La classification des sérine/thréonine kinases est basée sur la comparaison de la séquence des domaines catalytiques [361]. Le kinome humain est divisé en cinq grandes familles de sérine/thréonine kinases : la famille AGC, comprenant les protéines kinases A, G et C; la famille CAMK ( $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulin-dependent kinase), comportant les protéines kinases dépendantes de  $\text{Ca}^{2+}$ /CaM (Calmoduline); la famille CK1 (Casein kinase 1); la famille CMGC comprenant les CDK (Cyclin-dependent kinase), MAPK, GSK-3 (Glycogen synthase kinase-3) et CLK (Cdc2-like kinases); et la famille STE (Homologs of yeast sterile 7, 11 et 20 kinases) [361, 367, 368]. Il existe un très grand nombre de sous-familles et de membres de sérine/thréonine kinases. Le tableau V résume les fonctions générales de sérine/thréonine kinases en lien avec la présente étude.

**Tableau V.** Protéines sérine/thréonine kinases et leurs fonctions générales.

Protéines kinases	Fonctions	Références
<b>CDK</b>	Régulation du cycle et de la division cellulaire.	[369-371]
<b>MAPK</b>	Transduction des signaux dans une grande variété de réponses biologiques, différent de cellules en cellules.	[372, 373]
<b>PKC</b>	Transduction du signal et modulation des effets de plusieurs stimuli extracellulaires incluant les facteurs de croissances et les hormones.	[374, 375]
<b>PKB/Akt</b>	Composante critique des voies de signalisation intracellulaires qui exercent les effets des facteurs de croissance et de survie, et modulent la réponse à l'insuline et aux agents inflammatoires.	[376, 377]
<b>PDK1</b>	Activation de la PKB, croissance et prolifération cellulaire, protection contre les stimuli pro-apoptotiques et stimulation de la néo-angiogénèse.	[378]
<b>CKII</b>	Déifferentiation, prolifération et survie cellulaire.	[379, 380]
<b>CaMK</b>	Médiateur important de la mémoire et de l'apprentissage, homéostasie du calcium, sélection positive des cellules T et activation des cellules T CD8 <sup>+</sup> .	[381-384]
<b>GSK</b>	Métabolisme du glycogène, signalisation via l'insuline, les facteurs de croissance et les nutriments, rôle dans le destin des cellules durant l'embryogenèse, contrôle du cycle cellulaire, de l'apoptose et de la fonction des microtubules.	[385]
<b>PKA</b>	Signalisation via l'AMPc, régulation du cycle cellulaire	[386, 387]
<b>PKD</b>	Organisation de l'appareil de Golgi, régulation de la prolifération cellulaire et de l'apoptose, régulation de plusieurs voies de signalisation intracellulaire.	[388]

CDK, cyclin-dependent kinase; MAPK, mitogen-activated protein kinase; PKC, protein kinase C; PKB/Akt, protein kinase B/Akt; PDK1, 3-phosphoinositide-dependent kinase 1; CKII, casein kinase II; CaMK,  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulin-dependent kinase; GSK, glycogen synthase kinase; PKA, protein kinase A; PKD, protein kinase D; AMPc, adénosine monophosphate cyclique.

Le présent chapitre met l'accent sur les familles des protéines kinases C et des kinases dépendantes des cyclines. Celles-ci ont été sélectionnées parmi les autres sérine/thréonine kinases grâce à l'analyse *in silico* des sites de phosphorylation théoriques de la protéine DNMT1 humaine (UniProt ID : P26358; <http://scansite.mit.edu>; <http://networkin.info/search.php>; <http://www.phosida.com>). Cette analyse a tout d'abord permis d'identifier des sites de phosphorylation potentiels ainsi que des kinases candidates (**Tableau VI**). Par la suite, les résultats d'essais de phosphorylation utilisant la DNMT1 humaine comme substrat ont permis de diriger mon projet vers deux grandes familles de sérine/thréonine kinases : les protéines kinases C et les protéines kinases dépendantes des cyclines.

**Tableau VI.** Sites de phosphorylation théoriques de la protéine DNMT1 humaine. Les sites ont été identifiés à partir de Scansite, Networkin et Phosida (UniProt ID: P26358).

Kinases	Sites de phosphorylation
PKC $\zeta$	T166; T342; S745; T1239
PKC $\epsilon$	T166; S192; S387; S482; S1246
PKC $\alpha/\beta/\gamma$	T137; S161; T603; S607; S895
PKC $\delta$	T166; T342; T603
PKC $\mu$	S84; T342; T1141; S1342
CDK1	T137; S127; S154; T253; S714; S878; S954; S1105
CDK5	T137; S154; T253; T328; S714; S878; S954; S1105
CDK2	S127; S154; S714; S954; S1105
GSK-3	T137; S154
PKB/AKT	T166; S209; T249; T342; T1366
PKA	T162; T208; T327; T328; T603
CKII	T137; S192; S563; S1128
PDK1	T947; T1239
ERK1	S152
CaMKII	T166; S247; T327; T885

### 3.3 La famille des protéines kinases C

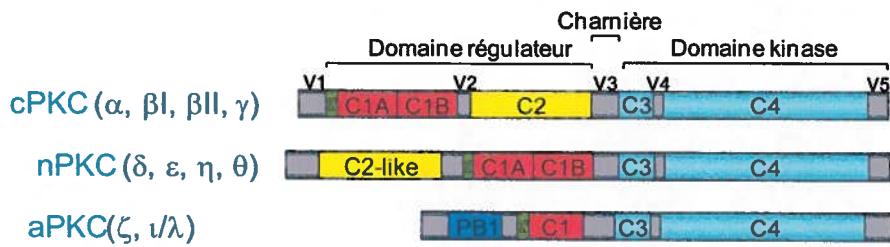
#### 3.3.1 Classification, structure et activation

Les protéines kinases C (PKC) forment une famille de sérines/thréonines kinases dépendantes de phospholipides, dont le premier membre a été identifié par Yasutomi Nishizuka et ses collègues en 1977 [389]. Elles sont exprimées de façon universelle et régulent un grand nombre de processus physiologiques, incluant la différentiation et la croissance cellulaire. La signalisation par les PKC est conservée à travers l'évolution, de la levure à l'humain, démontrant ainsi l'importance de cette famille dans la signalisation cellulaire. Les PKC peuvent être contrôlées par la phosphorylation de résidus sérines, thréonines et tyrosines qui influencent leur

stabilité, leur résistance aux protéases et phosphatases, leur interaction avec d'autres protéines, leur localisation cellulaire, leur activité et leur spécificité de substrat. Les PKC peuvent aussi être clivées par des caspases, générant un domaine kinase catalytiquement actif et un fragment du domaine de régulation qui peut agir comme un inhibiteur de l'enzyme complète. Les PKC peuvent également être activées par des cofacteurs lipidiques moins traditionnels (céramides, acide arachidonique) ou par des mécanismes indépendant des lipides (modifications oxydatives, nitration de tyrosines), leur permettant de moduler les voies de signalisation à travers la cellule et non pas seulement à la membrane plasmique [390].

Les PKC sont divisées en trois groupes : les isoformes conventionnelles, qui sont activés par le calcium, le diacylglycérol (DAG) et les esters de phorbol (cPKC;  $\alpha$ ,  $\beta$ I,  $\beta$ II et  $\gamma$ ); les isoformes nouveaux, qui sont activés par le DAG, mais insensibles au calcium (nPKC;  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\eta$  et  $\theta$ ); et les isoformes atypiques, qui sont insensibles au calcium et au DAG (aPKC;  $\zeta$  et  $\lambda/\iota$  (souris/humain)) [391]. La protéine kinase  $\mu$  (ou PKD (Protein kinase D) chez la souris) forme une classe distincte dans le kinome et est actuellement beaucoup plus similaire aux CaMK [392]. Les domaines catalytiques des PKC sont hautement conservés et les isoformes se distinguent plutôt par leur domaine de régulation [393]. Le domaine C-terminal comprend le domaine sérine/thréonine kinase (classe AGC) et est relié par une région variable V3 au domaine de régulation (**Figure 9**). Ce dernier possède trois éléments fonctionnels : 1) une région inhibitrice (site pseudo-substrat), 2) un domaine C1 (une copie ou en répétition en tandem —C1A, C1B) et 3) un domaine C2 ou PB1 (Phox and Bem1). Le site pseudosubstrat (PS) se caractérise par sa ressemblance à un substrat, mais dont la sérine/thréonine à phosphoryler est remplacée par une alanine. Cette région permet l'autoinhibition de l'enzyme. Le domaine C1 en tandem (C1A-C1B), présent pour les cPKC et nPKC, fonctionne comme motif de liaison au phorbol 12-myristate 13-acétate (PMA)/DAG. Les aPKC possèdent un domaine C1 atypique qui permet de lier le phosphatidylinositol 4,5-triphosphate (PIP<sub>3</sub>) et les céramides, mais pas le DAG/PMA. Seules les cPKC possèdent un domaine C2 et de ce fait, peuvent interagir avec des phospholipides anioniques de manière dépendante du calcium. Le domaine C2-like des nPKC ne contient pas les résidus d'acides aminés critiques pour la liaison au calcium. Enfin, les aPKC se distinguent également par leur domaine PB1, qui module les interactions avec d'autres protéines adaptatrices comprenant un domaine PB1, incluant p62, partitioning defective-6 (PAR-6) et MEK5 [394, 395]. Les aPKC sont d'ailleurs régulées principalement par les interactions protéine-

protéine et la phosphorylation par la phosphoinositide-dependent kinase-1 (PDK1).



**Figure 9.** Structure des domaines des isoformes de protéines kinases C (PKC). Les PKC ont un domaine kinase conservé (C3-C4) et des domaines de régulations plus variables. Tous les domaines de régulation des PKC possèdent un motif pseudosubstrat (vert; PS) situé en N-terminal du domaine C1 (rouge). Les domaines C1 en tandem (C1A-C1B) des cPKC et nPKC sont sensibles au phorbol 12-myristate 13-acétate (PMA)/diacylglycérol (DAG), tandis que le domaine C1 seul des aPKC ne lie pas le DAG/PMA. Le domaine C2 (jaune) des cPKC permet la liaison au calcium, tandis que le domaine C2-like des nPKC ne le lie. Les aPKC possèdent aussi un domaine d’interaction protéine-protéine PB1 (Phox and Bem 1). Les régions variables (V) des isoformes de PKC sont indiquées en gris. Adapté de Steinberg (2008) [390].

Tous les membres des PKC sont activés de façon allostérique, soit par certains lipides, soit par des protéines, ou une combinaison des deux. L'inactivité de l'enzyme est déterminée par l'interaction du domaine de régulation avec le domaine catalytique. Ceci est partiellement dirigé par l'interaction du site inhibiteur pseudosubstrat, situé dans le domaine de régulation, avec la niche de liaison au substrat localisée au niveau du domaine catalytique. Le recrutement des PKC à la membrane mène à une conformation ouverte par la simple libération du site pseudosubstrat. Ceci permet la phosphorylation subséquente des PKC sur deux ( $\zeta$ ,  $\iota$ ) ou trois ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\eta$ ,  $\theta$ ) sites conservés (AGC kinases) [396]. La phosphorylation permet possiblement la stabilisation de la conformation active de l'enzyme. Les kinases en amont effectuant cette phosphorylation sont souvent communes à tous les membres, telles que PDK1 et mTOR (Mammalian target of rapamycin). En plus de la phosphorylation activatrice, celle de certains résidus Ser, Thr et Tyr peut contrôler la localisation cellulaire et la fonction des PKC. Par exemple, la phosphorylation de la Tyr256 de PKC $\iota$  induit sa translocation au noyau cellulaire [397].

La translocation des PKC à la membrane plasmique a longtemps été considérée comme la principale caractéristique de leur activation, et a fréquemment été utilisée comme mesure de leur activation dans la cellule. Ce modèle simpliste de l'activation des PKC n'est toutefois pas suffisant pour expliquer le contrôle spatio-temporel complexe de la localisation des PKC dans la cellule. En effet, les cPKC transloquent rapidement et temporairement à la membrane plasmique par un mécanisme mettant en jeu l'accumulation de DAG dérivé de la phospholipase C (PLC). Cependant, dans les cellules démontrant une réponse diphasique au DAG, les PKC $\alpha$  et  $\beta$ II sont

relâchées de la membrane plasmique via un processus qui requiert l'autophosphorylation des PKC [398, 399]. Ces PKC s'accumulent par la suite dans un site périnucléaire nommé « le péricentron », qui est une partie des endosomes de recyclage [400, 401]. Les PKC peuvent transloquer au niveau de compartiments spécialisés, comme les radeaux lipidiques [402], les mitochondries [403], le réticulum endoplasmique [404] et l'appareil de Golgi [405]. Elles peuvent également transloquer dans le noyau [406, 407]. En fait, tous les isoformes de PKC ont été détectés dans le noyau des cellules sous différentes conditions, bien que seule PKC $\delta$  possède une séquence NLS typique dans son domaine V5 [408]. Des séquences ressemblant au motif de ciblage au noyau bipartite de *Xenopus* ont toutefois été identifiées dans le cas des cPKC et les aPKC [409]. Il a par ailleurs été démontré que la phosphorylation de la tyrosine 256 de PKC $\zeta$  facilitait son import au noyau, suggérant que des mécanismes alternatifs peuvent permettre la translocation des PKC au noyau. Suivant le traitement des cellules PC12 au NGF (Nerve growth factor), la Tyr256 est rapidement phosphorylée et précède l'entrée de PKC $\zeta$  dans le noyau cellulaire [397]. La phosphorylation de la Tyr256 augmente la liaison de PKC $\zeta$  à l'importine- $\beta$ , inhibée lorsque la Tyr256 est mutée par une Phe. Cette liaison semble être importante pour l'importation de cette PKC au noyau.

### 3.3.2 Fonctions

La majorité des PKC sont exprimées de façon ubiquitaire, bien que quelques unes montrent un patron d'expression tissu-spécifique. Tel est le cas pour PKC $\gamma$  qui est exprimée dans les neurones [410], PKC $\eta$  qui est présente dans l'épithélium squameux et les muscles [411], et PKC $\theta$  que l'on retrouve dans les tissus lymphoïdes [412] (**Tableau VII**). Les PKC $\alpha$ , PKC $\beta$  et PKC $\delta$  sont les isoformes les plus abondantes dans une variété de tissus [413]. Les PKC régulent divers processus cellulaires incluant la prolifération, l'apoptose, la survie et la migration (**Tableau VII**). Ces enzymes ont d'abord été caractérisées comme des kinases pro-mitogéniques, dépendamment des isoformes et du type cellulaire. Cependant, certaines PKC peuvent inhiber la progression du cycle cellulaire, comme c'est le cas pour PKC $\delta$  [414]. Cette dernière est d'ailleurs considérée comme étant une protéine inhibitrice de la croissance cellulaire, ou pro-apoptotique [415, 416]. D'autres PKC ont des rôles contradictoires. En effet, PKC $\alpha$  est impliquée dans la prolifération cellulaire des gliomes [417], mais elle induit l'arrêt du cycle cellulaire dans les cellules de la glande mammaire MCF10A et inhibe leur croissance [418, 419]. Les fonctions

spécifiques aux différents isoformes de PKC ont pu être identifiées en partie par les modèles de souris génétiquement modifiées ou « knock-out » [420]. Ces souris montrent des phénotypes variés, reflétant les rôles joués par les différents isoformes. Seule la délétion du gène PKC $\gamma$ /λ est létale pour l'embryon. Ceci est probablement dû au rôle important que joue cette PKC dans la sécrétion et l'action de l'insuline [421]. Les PKC participent donc à une variété de voies de transduction du signal menant à des réponses diversifiées et complexes, et ce, dépendamment du type cellulaire.

**Tableau VII.** Fonctions et expression des différents isoformes de PKC.

Fonctions	Expression
PKC $\alpha$ Prolifération [417], mais aussi arrêt du cycle cellulaire et inhibition de la croissance [418]; anti-apoptotique [422], mais aussi pro-apoptotique [423]; différenciation [424]; migration et adhésion cellulaire [418, 425]	Ubiquitaire
PKC $\beta$ Développement et activation des cellules B [426]; signalisation via Fc $\epsilon$ RI et BCR [427, 428]; dégranulation et activation des mastocytes [428, 429]; signalisation via récepteur de l'insuline [430]	Ubiquitaire
PKC $\gamma$ LTP [431]; LTD [432]	Neuronale
PKC $\delta$ Inhibition de la croissance cellulaire [433, 434]; différenciation [435]; suppresseur de tumeur [436]; pro-apoptotique [437]; régulation de transporteur cationique [438]; activation de la voie MAPK [439]; expression de l'oxyde nitrique synthétase [440]; stimulation de la pyruvate déshydrogénase [441]	Ubiquitaire
PKC $\epsilon$ Prolifération [442] et survie cellulaire [443]; différenciation [444]; expression des gènes [445]; motilité et invasion [446]; contraction musculaire [447]; métabolisme [448]; transport [449]; exocytose [450]; endocytose [451]	Ubiquitaire;
PKC $\eta$ Différenciation et arrêt du cycle cellulaire [435]; Développement des cellules B précoces [452]	Épithélium squameux
PKC $\theta$ Signalisation TCR conduisant à l'activation, la différenciation et la survie cellulaire [453, 454]	Muscles, tissus lymphoïdes, système nerveux
PKC $\zeta$ Prolifération et synthèse de l'ADN (via Ras-MAPK)[455] [456], mais aussi inhibition de la croissance [457]; régulation de NF $\kappa$ B [458]; extension des neurites [459]; polarité cellulaire [460]; apoptose [461]; signalisation via l'insuline et homéostasie du glucose [462]; LTP (PKM $\zeta$ ) [463].	Ubiquitaire; PKM $\zeta$ : neuronale
PKC $\gamma/\eta$ Survie [464]; prolifération [465]; transport du glucose [466]; régulation de NF $\kappa$ B [467]; anti-apoptotique [468]; polarité cellulaire [460].	Ubiquitaire

BCR, B cell receptor; LTP, long term potentiation; LTD, long term depression; TCR, T cell receptor; MAPK, mitogen-activated protein kinase; NF- $\kappa$ B, nuclear factor  $\kappa$ B.

### 3.3.3 La PKC $\zeta$

#### Activation

Le mécanisme d'activation de la PKC $\zeta$  consiste principalement en deux événements : la libération du domaine pseudosubstrat de la cavité permettant la liaison au substrat et la phosphorylation du domaine kinase [469]. Suite à la libération de l'autoinhibition, certains lipides

membranaires, comme la phosphatidylsérine, et métabolites lipidiques, comme le diacylglycérol, vont aider à la libération du PS du site actif. La PKC $\zeta$  est aussi activée par d'autres lipides, tels que les phosphatidylinositols (PI) [470], l'acide phosphatidique [471], l'acide arachidonique [472] et les céramides [472]. La PKC $\zeta$ , tout comme son plus proche parent, la PKC $\iota$ , est un médiateur critique de la transduction des signaux mitogènes. Ceci a d'abord été observé par le groupe de J. Moscat en 1993 [455], qui démontrait que la PKC $\zeta$  était requise pour la maturation des ovocytes de *Xenopus* et pour la synthèse de l'ADN dans les fibroblastes, une conséquence de l'activation de Ras. Presqu'en même temps, Nakanishi *et al.* [470] montraient que la PKC $\zeta$  pouvait être activée *in vitro* par un produit lipidique de la PI3K (Phosphatidylinositol 3 kinase), le PIP<sub>3</sub>. Le PIP<sub>3</sub> interagit directement avec le domaine pleckstrin homology (PH) de PKB/Akt (Protein kinase B/Akt) et de PDK1, et il a été démontré que la PKC $\zeta$  était phosphorylée par cette dernière sur la T410. PDK1 interagirait avec la PKC $\zeta$  via son motif hydrophobique, puisque celui-ci inclus une courte séquence, Phe-Glu-Gly-Phe-Glu-Tyr, qui est très semblable au site de liaison des protéines interagissant avec PDK1 [396]. En absence de PDK1 dans des cellules embryonnaires souches, PKC $\zeta$  n'est pas phosphorylée sur la T410 [473]. De plus, la mutation de cette Thr en alanine (T410A) induit la perte de son activité, indiquant que la phosphorylation de la T410, probablement par PDK1, est essentielle pour son activation. L'activation de la PKC $\zeta$  requiert également la phosphorylation du résidu T560 situé dans le motif « turn ». La phosphorylation de ce dernier pourrait se faire par autophosphorylation ou par la phosphorylation par d'autres PKC [474]. Des interactions protéiques spécifiques régulent également l'activité de PKC $\zeta$ . PAR-4 (Prostate apoptosis response-4) normalement induite durant l'apoptose, interagit avec le motif C1 de PKC $\zeta$  et inhibe son activité [461]. Le domaine PB1 permet également l'interaction de PKC $\zeta$  à plusieurs protéines, comme PAR-6 et p62/ZIP (Zeta-interacting protein), modulant sa liaison à des complexes de signalisation spécifiques suite à une stimulation [475].

## Fonctions

PKC $\zeta$  joue un rôle important dans la survie et la prolifération cellulaire. En effet, plusieurs études ont démontré son implication dans la voie des MAPK, dans une variété de types cellulaires. La stimulation des cellules de singe COS avec du sérum ou avec le TNF- $\alpha$  (Tumor necrosis factor  $\alpha$ ) active les MAPK MEK1 et ERK1 via PKC $\zeta$  [476]. Dans les macrophages

alvéolaires humains, le lipopolysaccharide (LPS) active MEK1, ERK1 et ERK2 via l'activation de PKC $\zeta$  [477]. PKC $\zeta$  est également importante pour l'activation du facteur de transcription NF- $\kappa$ B suite à la stimulation au TNF- $\alpha$  et à IL-1 [458, 478]. La délétion génétique de PKC $\zeta$  chez la souris a permis d'observer des anomalies dans les fonctions immunitaires reliées au BCR et à l'activation des voies ERK et NF- $\kappa$ B [479, 480]. On observe aussi des défauts dans l'activation de NF- $\kappa$ B et IKK (I $\kappa$ B kinase) dans des extraits de poumons de souris déficientes en PKC $\zeta$  injectées au TNF- $\alpha$  ou au LPS, de même qu'une augmentation de l'apoptose dans les fibroblastes PKC $\zeta^{-/-}$  stimulés au TNF- $\alpha$  [479]. De plus, PKC $\zeta$  semble jouer un rôle dans l'activation de la protéine kinase p70 ribosomal S6 (p70S6K), une kinase phosphorylée et activée en réponse aux signaux mitogènes modulant la traduction d'ARNm qui encodent des protéines ribosomiques et des facteurs d'elongation de la traduction [481, 482].

L'analyse phénotypique des souris PKC $\zeta^{-/-}$  a également permis d'observer une altération significative dans le développement des organes lymphoïdes secondaires des jeunes animaux [479]. Bien que la structure générale de la rate de ces souris soit préservée, des défauts notables dans la zone marginale et dans les follicules de cellules B de la pulpe blanche ont été observés, en plus de défauts dans les ganglions périphériques et mésentériques et au niveau des plaques de Peyer, où la ségrégation entre les zones de cellules B et T est mal définie [479]. Il semble que l'augmentation de l'apoptose spontanée et la réduction de la réponse proliférative à la signalisation via le BCR dans les cellules B soient en cause [480] et impliquent la protéine PAR-4 [483]. Un rôle critique de PKC $\zeta$  afin de favoriser le transport du glucose a par ailleurs été démontré dans la signalisation à l'insuline [466]. PKC $\zeta$  régule l'homéostasie du glucose en partie par la stimulation de la translocation de GLUT4 (Glucose transporter type 4) [462, 484], le transporteur majeur du glucose en réponse à l'insuline. PKC $\zeta$  joue également un rôle dans la polarité cellulaire, fondamentale pour la fonctionnalité cellulaire. Des études ont démontré que l'activité et les interactions via le domaine PB1 de PKC $\zeta$  sont essentielles dans le contrôle de la polarité cellulaire des cellules épithéliales et impliquerait la liaison à PAR-3 et PAR6 [485, 486]. Enfin, un isoforme court de PKC $\zeta$ , appelé PKM $\zeta$ , est exprimé dans le cerveau et joue un rôle dans la maintenance de la potentialisation à long terme (LTP) [487, 488]. PKM $\zeta$  est le produit de l'épissage alternatif de l'exon 1 du gène *PKC $\zeta$*  et correspond au domaine catalytique [489].

Bien que l'on retrouve PKC $\zeta$  en grande partie dans le cytoplasme des cellules, elle est aussi présente dans le noyau. Suite à la stimulation des cellules de rat PC12 au NGF [490] ou dans les cellules de rat H9c2 en hypoxie ischémique [491], PKC $\zeta$  transloque dans le noyau. Son rôle exact dans le noyau reste encore à être déterminé, mais il a été démontré que PKC $\zeta$  phosphorylait la protéine nucléaire nucléoline de façon dépendante du NGF [490]. Une analyse en microscopie immunoélectronique a permis de localiser PKC $\zeta$  au niveau de la matrice nucléaire interne liée à la chromatine [409]. Plusieurs fonctions ont lieu dans cette région, notamment la réPLICATION de l'ADN, l'expression des gènes et la phosphorylation de protéines [492, 493]. La protéine A1 des hnRNP (Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins) a également été identifiée comme substrat pour PKC $\zeta$  dans le noyau [494]. Plusieurs autres substrats ont été identifiés *in vitro* comme étant les cibles des PKC, tels que l'histone H1 et p53, cependant ces études sont incomplètes et, dans plusieurs cas, l'effet de la phosphorylation n'a pas été déterminé [495]. Enfin, PKC $\zeta$ , ainsi que PKC $\iota$ , possède dans sa séquence des signaux d'import et d'export nucléaires [496]. Ceci suggère un rôle dans la phosphorylation de facteurs de transcription ou des composantes de la matrice nucléaire en réponse à des signaux mitogènes, reliant ainsi la signalisation membranaire aux événements nucléaires.

### 3.3.4 PKC et cancers

Des aberrations dans la voie de signalisation des PKC ont été impliquées dans le développement de plusieurs maladies humaines, incluant les complications métaboliques et cardiovasculaires associées au diabète [497], des dysfonctions du système nerveux central [498], la maladie d'Alzheimer et la dégénération neuronale [499], de même que des désordres cardiovasculaires comme l'hypertrophie cardiaque [500], la prédisposition à l'ischémie cardiaque [501] et l'athérosclérose [502]. Cependant, la maladie la plus fréquemment associée aux PKC est le cancer [374]. C'est à la découverte de l'activation des PKC par l'agent promoteur de tumeurs, le phorbol ester 12-*O*-tétradécanoylephorbol-13-acétate (TPA), qu'un lien entre l'oncogenèse et les PKC a été établi pour la première fois [503]. Des études de surexpression des PKC dans les fibroblastes de rat R6 [504] et de souris NIH 3T3 [505], altérant la croissance cellulaire et augmentant la tumorogénicité, ont ensuite appuyé ce lien. Enfin, il a été démontré que la co-expression de PKC et de plusieurs oncogènes (Ras, Myc et Fos) augmentait le phénotype des cellules transformées [506].

Les PKC peuvent réguler différents aspects lors de la transformation cellulaire, incluant l'hyperprolifération, l'altération ou l'inhibition de la différentiation, migration, invasion et métastasie, ainsi que la résistance aux stimuli apoptotiques, comme les agents anticancéreux [374, 507]. Des modèles de cancers *in vivo* et *in vitro* ont permis d'élucider plus spécifiquement les effets des différents isoformes dans le cancer. Plusieurs études ont démontré que l'augmentation de l'activité de PKC $\alpha$  est associée à une plus grande mobilité et invasion des cellules cancéreuses, et que son inhibition permettait de renverser ce phénotype [508, 509]. Un rôle semblable est également observé pour PKC $\beta$  dans les cellules intestinales cancéreuses, en plus d'un rôle dans l'angiogenèse [510-512]. La PKC $\epsilon$  est l'isoforme avec le plus grand potentiel oncogénique et aussi le plus étudié dans les cancers. En effet, plusieurs études identifient la PKC $\epsilon$  comme une protéine pro-cancérogène puisqu'elle stimule l'oncogenèse dans les cellules de fibroblaste, de l'épithélium et de la prostate [374] et qu'elle inhibe la mort cellulaire, probablement via la famille de protéines Bcl-2 [513-515]. Elle a de même été impliquée dans la survie cellulaire des gliomes et des cellules cancéreuses de la thyroïde [516, 517]. Elle est d'ailleurs surexprimée dans un grand nombre de cancers, tels que le cancer du colon [518], du sein [519], de l'estomac [520], de la prostate [521], du poumon [522] et leucémique [523]. Il a aussi été démontré que sa contribution à la cancérogenèse dépendait principalement de la cascade Ras/Raf/MAPK, l'une des voies les plus étudiées de la transmission du signal [524, 525]. Enfin, bien qu'il existe moins d'études sur le rôle des aPKC dans les cancers, celles-ci sont tout de même associées à la cancérogenèse. Effectivement, PKC $\zeta$  a été impliquée dans la résistance à l'apoptose de mélanomes murins [526] et dans la prolifération de gliomes humains [527], mais sa surexpression dans les cellules cancéreuses de la prostate inhibe l'invasion et la métastasie [528]. Une augmentation de l'ARNm de PKC $\zeta$  a aussi été proposée comme marqueur potentiel pour la détection des néoplasmes du colon [529]. Cependant, la contribution exacte de PKC $\zeta$  dans le cancer semble bien complexe. La présence du très similaire isoforme PKC $\iota$  dans la plupart des tissus laisse présager que les effets observés dans les cancers pourraient être partagés entre ces deux isoformes atypiques. L'implication de PKC $\iota$  dans les cancers a d'ailleurs été décrite à plusieurs reprises et c'est aussi un gène amplifié dans un grand nombre de tumeurs [530, 531].

Comme les PKC sont impliquées dans la formation et la progression des cancers, une variété d'inhibiteurs à large spectre ont été développés, testés *in vitro* et *in vivo* et, dans certains cas, utilisés dans le traitement du cancer chez l'humain [507]. Bien que la plupart de ces

inhibiteurs aient démontré des propriétés anticancéreuses dans des modèles expérimentaux, leur efficacité clinique n'a malheureusement pas rencontré les attentes. La combinaison des ces inhibiteurs avec des agents chimiothérapeutiques classiques semble cependant être une avenue intéressante dans le traitement du cancer du poumon [532], tel que démontré lors d'une étude clinique en phase III [507]. Le développement d'inhibiteurs plus spécifiques pour certains isoformes de PKC pourrait être très utile dans le traitement des cancers chez l'humain.

### 3.4 La famille des protéines kinases dépendantes des cyclines

Les protéines CDK sont des sous-unités catalytiques d'une grande famille de sérine/thréonine kinases hétérodimériques, dont les membres les mieux caractérisés sont en jeu dans le contrôle de la progression du cycle cellulaire. Les partenaires d'activation des CDK, les cyclines (Cyc), sont des molécules synthétisées et dégradées à chaque cycle cellulaire, et par conséquent, elles sont appelées les sous-unités régulatrices. Bien que cette propriété soit utilisée afin de décrire cette famille de kinases, certains partenaires d'activation des CDK n'adhèrent pas à ce type de régulation. En plus de la liaison à une cycline, les CDK doivent être phosphorylées pour être actives, comme c'est le cas pour CDK2 qui doit être phosphorylée sur la thréonine 160 pour être fonctionnelle [533]. Une fois activé, le dimère CDK/Cyc est stable, avec une dissociation dont la demi-vie est de plusieurs heures, allant de 4h à 15h pour CDK1/CycA et CDK1/CycB respectivement [534]. L'inactivation des CDK peut se faire de différentes façons. Par exemple, la sous-unité régulatrice cycline peut être dégradée par la protéolyse spécifique dépendant de l'ubiquitine [535]. Autrement, le complexe CDK/Cyc peut s'associer avec une protéine inhibitrice, ou peut être inactivé par la phosphorylation. C'est d'ailleurs le cas pour CDK1, qui devient inactive suite à la phosphorylation de ses résidus tyrosines 14 et 15 [536, 537]. Ajoutant à la complexité de leur régulation, les CDK possèdent des surfaces de liaison interchangeables qui leurs permettent d'effectuer différentes combinaisons CDK/Cyc. Pour certains dimères, les rôles physiologiques sont encore inconnus.

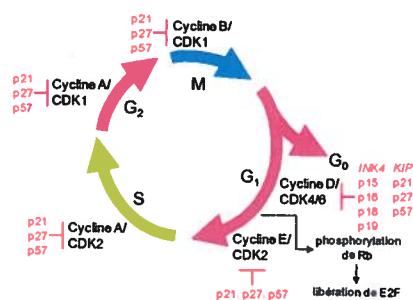
#### 3.4.1 Les isoformes de CDK

Chez l'humain et la souris, il existe environ une vingtaine de protéines de la famille des CDK, incluant 11 protéines CDK (CDK1-11) [361, 538], qui possèdent une homologie avec CDK1, le premier membre de la famille identifié. Les neuf autres membres de cette famille sont

PCTAIRE1-3, PFTAIRE1-2, PITSLRE, CDC2L5 (Cell division cycle 2-like protein 5), CRK7 (CDC2-related protein kinase 7) et CCRK (Cell cycle related kinase), de même que cinq protéines de la famille CDK-like (CDKL1-5; famille CDKL). On compte environ 29 cyclines différentes, contenant toutes un domaine cycline (cyclin box), mais plusieurs d'entre elles n'ont pas encore été identifiées comme des partenaires de CDK [539]. Bien que l'on dénombre une grande quantité de complexes CDK/cycline, seulement quelques-uns sont directement impliqués dans la régulation du cycle cellulaire. La fonction et la régulation des autres complexes ne sont malheureusement que très peu connues [540].

### 3.4.2 Régulation de la progression du cycle cellulaire

Cinq des 11 CDK sont habituellement associées au contrôle du cycle cellulaire, soient CDK1, 2, 3, 4 et 6 [540]. CDK2, 4 et 6 sont impliquées dans l'interphase tandis que CDK1 est plutôt mitotique (**Figure 10**). Toutefois, seule CDK1 semble être essentielle pour contrôler le cycle cellulaire chez les mammifères [541]. En effet, des embryons de souris déficients en CDK2, 3, 4 et 6 effectuent une organogenèse normale, en plus de se développer jusqu'en milieu de gestation. Les fibroblastes embryonnaires dérivés de ces embryons sont également capables de proliférer *in vitro* [541]. De plus, les phénotypes légers observés pour les souris déficientes en CDK2, 3, 4 et 6 contrastent fortement avec celui observé pour CDK1, dont la délétion est létale pour l'embryon au stade de développement précoce [541]. Lors du contrôle de la progression du cycle cellulaire, les CDK1, 2, 4 et 6 s'associent à différentes cyclines. CDK4 et 6 sont activées par les cyclines de types D, CDK2 par les cyclines de types E et A, et CDK1 par les cyclines de types A et B. De plus, toutes ces CDK sont capables de phosphoryler la protéine Rb et d'inhiber sa fonction de répresseur transcriptionnel [542].



**Figure 10.** Les CDK et le cycle cellulaire. La progression du cycle cellulaire est gouvernée par les kinases dépendantes des cyclines, dont l'activité est régulée par l'association à des cyclines, par la phosphorylation et par les inhibiteurs de CDK (la famille des inhibiteurs de CDK4 (INK) : p15, p16, p18 et p19; et la famille KIP (kinase inhibitor protein) : p21, p27 et p57).

La progression de la phase G1 est régulée par un mécanisme complexe mettant en jeu au moins trois CDK (CDK4, 6 et 2), ainsi que leurs régulateurs [543, 544]. Initialement, les signaux mitogènes induisent la synthèse des cyclines de types D et possiblement le repliement et le transport de CDK4 et 6 au noyau cellulaire. Les complexes actifs CDK4/CycD et CDK6/CycD phosphorylent et inactivent, entre autres, les membres de la famille de protéines Rb, incluant p107 et p130 (Related Rb proteins; RBR). Les protéines Rb fonctionnent comme répresseurs transcriptionnels par la liaison et la modulation de l'activité de facteurs de transcription, tels que les membres de la famille E2F, mais aussi des HDAC et des complexes de remodelage de la chromatine [545]. Les cibles cruciales des complexes Rb-E2F sont les cyclines de types E, requises pour l'activation de CDK2 et l'accomplissement normal de la phase G1. L'activation de la CDK2 permet l'inactivation irréversible des protéines de la famille Rb, rendant les cellules indépendantes aux signaux mitogènes [544]. Ce processus correspond aussi au point de restriction, défini comme étant le stade durant la phase G1 où les cellules ne requièrent plus de stimuli mitogènes pour effectuer la division cellulaire; elles deviennent engagées [539]. En plus de phosphoryler Rb, CDK2 semble aussi essentielle pour l'initiation de la réPLICATION de l'ADN, car elle facilite l'interaction des protéines de maintenance des chromosomes MCM (Minichromosome maintenance) au niveau des origines de réPLICATION [546-548]. Lors de l'entrée en phase S, le complexe CDK2/CycE doit donc absolument être inhibé afin d'éviter la re-réPLICATION de l'ADN [549]. CDK2 phosphoryle aussi des protéines en jeu dans la réPLICATION et la réparation de l'ADN, dans la maturation et la ségrégation des centrosomes, dans la régulation protéolytique [543], ainsi que son propre inhibiteur p27<sup>Kip1</sup>, facilitant sa dégradation via le protéasome [549]. L'inactivation de Rb permet également la transcription de gènes essentiels pour les phases subséquentes du cycle cellulaire, notamment les CycA et CycB. La CycA s'accumule durant la phase S, tandis que la synthèse de la CycB devient évidente seulement dans la transition G2→M [539]. CDK2 lie la CycA nouvellement synthétisée lorsqu'elle n'interagit plus avec la CycE et phosphoryle une grande quantité de protéines requises pour l'accomplissement et la sortie de la phase S. Le complexe CDK2/CycA phosphoryle les protéines Rb et des facteurs de transcription, ainsi que des protéines en jeu dans la réPLICATION et la réparation de l'ADN, dans la modification des histones, dans la protéolyse dépendante de l'ubiquitine et dans les points de contrôle du cycle cellulaire [543].

C'est vers la fin de la phase S que CDK1 s'associe avec la CycA et phosphoryle un bon nombre de substrats, dont plusieurs en commun avec CDK2/CycA. Durant la phase G2, les CycA sont dégradées par protéolyse via la voie de l'ubiquitine/protéasome, tandis que les cyclines de types B sont activement transcrtes. En conséquence, CDK1 s'associe alors à CycB, une association qui semble essentielle pour amorcer la mitose [539]. Les complexes CDK1/CycB phosphorylent plus de 70 protéines et régulent ainsi plusieurs événements durant la transition G2-M et la progression de la mitose. La listes des protéines phosphorylées pourrait être encore plus longue puisqu'il a été démontré que, chez la levure, CDK1 phosphoryle plus de 200 substrats [550]. Chez les mammifères, CDK1 phosphoryle des protéines en jeu dans la condensation des chromosomes, la fragmentation de l'appareil de Golgi, la rupture de la membrane nucléaire, la protéolyse et la sortie de la mitose [539, 540]. C'est finalement l'inactivation des complexes CDK1/CycB qui marque la sortie de la mitose. Ceci est accompli par la dégradation de la CycB via la voie de l'ubiquitine/protéasome, régulée par le complexe d'initiation de l'anaphase [551].

### 3.4.3 Rôles biologiques des autres CDK

Les CDK7-11 sont en jeu dans la transcription, qui touche parfois directement au contrôle du cycle cellulaire. CDK7 est une composante du complexe CAK (CDK-activating kinase), qui phosphoryle et active les CDK associées au cycle cellulaire [533, 552, 553]. De plus, CAK, de concert avec d'autres sous-unités, forme le facteur de transcription général TFIIH en jeu dans le dégagement des promoteurs et de la progression de la transcription [553-557]. CDK8 s'associe à la CycC et CDK9 à la CycT afin de réguler la transcription par la phosphorylation du domaine C-terminal de la grande sous-unité de la polymérase II [558]. CDK8/CycC phosphoryle aussi CycH, inhibant l'activité de CAK [559]. Aucun partenaire de liaison n'a encore été identifié pour CDK10. CDK10 inhibe la transactivation du facteur de transcription Ets2, un régulateur de l'expression de CDK1 [560]. Enfin, CDK11 s'associe avec CycL et interagit avec les facteurs précurseurs de l'épissage des ARNm, RNPS1 (RNA-binding protein with serine-rich domain 1) et 9G8 [561]. CDK11/CycL interagit aussi avec l'ARN polymérase II, l'impliquant dans la production des transcrits et la régulation des ARN [562].

De son côté, CDK5 est unique dans la famille des CDK. Bien qu'elle ait été identifiée grâce à son homologie (60%) avec CDK1 et CDK2, jusqu'à présent, aucun rôle ne lui a été attribué dans la progression du cycle cellulaire [563-565]. Toutefois, sa présence dans

l'organisme est essentielle puisque sa délétion chez la souris est létale pour l'embryon [566]. De plus, ces mêmes embryons montrent beaucoup d'anomalies dans le développement et la structure de leur système nerveux [566]. L'activité de CDK5 est plus élevée dans le système nerveux [567] comparativement aux niveaux constitutifs retrouvés dans les autres tissus [568]. D'ailleurs, plusieurs rôles lui sont attribués dans le système nerveux, où elle a principalement été étudiée jusqu'à maintenant. En plus de jouer un rôle important dans l'architecture du système nerveux central [566, 569, 570], elle joue également un rôle dans les processus de migration neuronale, d'extension des neurites et de formation de la synapse durant le développement du cerveau ainsi que dans les activités synaptiques des neurones matures et dans la mort cellulaire neuronale associée aux maladies neurodégénératives, telle que la maladie d'Alzheimer [571-574].

CDK5 est activée par l'interaction avec p35 [575], p39 [576] ou p25, cette dernière étant le produit de clivage de la protéine p35 [577, 578]. Ces protéines sont surtout exprimées dans le cerveau. La protéine p35 possède une très courte demi-vie (20 à 30 minutes) [579], comparativement à p25, qui est beaucoup plus stable. De plus, p25, qui ne possède pas de site de myristylation en N-terminal, se retrouve concentré dans le soma et le noyau, contrairement à p35 qui est présent dans toute la cellule neuronale [580]. Par conséquent, il est logique de croire que l'association de CDK5 à p25 l'implique dans des rôles différents que lorsqu'elle est associée à p35. Il est probable que la génération de p25, suite à un stress neurotoxique, perturbe la régulation normale de CDK5, causant une activation prolongée et une localisation aberrante. Les mécanismes qui régissent les effets neurotoxiques de p25 restent cependant à être identifiés. CDK5 s'associe aussi aux cyclines de types D et E. Les complexes CDK5/CycD et CDK5/CycE phosphorylent plusieurs protéines en jeu dans la transcription, dans les fonctions neuronales, dans la migration des neurones et dans la transmission synaptique [581]. De plus, CDK5 phosphoryle plusieurs substrats également phosphorylés par CDK1 et CDK2, comme p53 et Rb [582]. Bien qu'il existe plusieurs ressemblances avec CDK1 et CDK2 au niveau de sa régulation, CDK5 n'est cependant pas inhibée par les sous-unités inhibitrices de CDK (CKI), tels que p21 et p27, lorsqu'elle est associée à p35 [583].

La présence de CDK5 est également détectée dans le noyau des neurones de souris [584] et il semble qu'elle agisse indépendamment de ses activateurs [563]. Dans le noyau, il a été démontré que CDK5 pouvait bloquer le cycle cellulaire, mais cette fonction n'impliquerait pas son activité catalytique [585]. CDK5 régule aussi la transcription, mais ceci n'implique pas

forcément sa présence au noyau. Il a été démontré que STAT3 était phosphorylé par CDK5 sur un résidu activateur [586-588]. De plus, la phosphorylation de Rb par CDK5 cause une réentrée des neurones post-mitotiques dans le cycle cellulaire, et explique possiblement le taux élevé de mort cellulaire programmée neuronale observé dans l'embryogenèse tardive [582]. De même, la phosphorylation de ATM (Ataxia-telangiectasia mutated) par CDK5 active et induit la mort cellulaire neuronale via la réentrée dans le cycle cellulaire [589]. Cette capacité de CDK5 à réactiver le cycle cellulaire via la phosphorylation de Rb ou de ATM contraste fortement avec son habileté à le bloquer.

CDK5 est également impliquée, par la phosphorylation de p53, dans la stimulation de l'apoptose lors d'un stress génotoxique et oxydatif subit par les neurones. Cette phosphorylation prévient l'association de p53 avec le facteur HDM2 (Human double minute 2), qui facilite son ubiquitination et sa dégradation [590]. La phosphorylation de p53 par CDK5 le stabilise donc dans le noyau et induit l'expression de gènes pro-apoptotiques et l'apoptose mitochondriale subséquente [590]. Enfin, il a été démontré que CDK5 pouvait phosphoryler Sds3 (Suppressor of defective silencing protein 3), une composante fondamentale du complexe co-répresseur mSin3-HDAC1 [591]. Cette phosphorylation augmente l'activité histone désacétylase de HDAC1 ainsi que son efficacité à réprimer la transcription. Un autre groupe a cependant démontré que CDK5 associée à p25 inhibait plutôt HDAC1, causant une activité aberrante du cycle cellulaire par l'augmentation du nombre de bris double-brins de l'ADN [592]. Puisque Rb et Sds3 recrutent HDAC1 au niveau des promoteurs des gènes, les effets opposés de CDK5 sur la transcription des gènes contrôlés par ces derniers illustrent bien sa capacité à stimuler ou inhiber le recrutement d'enzymes impliquées dans la répression de la transcription. CDK5 possède donc une versatilité fonctionnelle et il est possible que ses rôles, encore inconnus dans les cellules non-neuronales, mettent en jeu des fonctions opposées telles qu'observées dans les cellules neuronales.

### 3.4.4 Les CDK comme cibles thérapeutiques dans le cancer

Bien que les kinases sont impliquées dans la plupart des voies reliées aux cancers, le cycle cellulaire est directement en lien avec la prolifération et le développement tumoral [593]. De plus en plus de données indiquent que la dérégulation des kinases associées au cycle cellulaire peut résulter en des défauts observés dans les cancers, tels que la prolifération incontrôlée et la division cellulaire aberrante aboutissant à l'instabilité génomique. Jusqu'à maintenant, seulement

*CDK4* a été trouvé comme étant mutée dans les mélanomes [594-596]. *CDK6* est surexprimé dans certaines leucémies [597, 598], de même que, avec *CDK4*, dans les sarcomes, les gliomes, les cancers du sein, les lymphomes et les mélanomes [371]. *CDK1* est également surexprimé dans certaines tumeurs CIN (Chromosomal instability), où l'on retrouve beaucoup d'aberrations dans le nombre ou la taille des centrosomes [599, 600]. De plus, on observe une surexpression de cyclines et l'inactivation de CKI dans une forte proportion de cancers, conduisant à la dérégulation de l'activité des CDK. La plupart des cancers humains possèdent d'ailleurs des mutations ou des altérations épigénétiques au niveau des régulateurs de CDK, particulièrement les inhibiteurs INK4 (INK4A, B, C, D), et les familles Cip et Kip (p21, p27, p57) ainsi que les CycD et CycE, ou de leurs substrats, principalement Rb [544].

Cela fait plus d'une décennie que les CDK sont considérées comme cibles potentielles dans le traitement des cancers [601]. Certains inhibiteurs ont déjà été testés expérimentalement. Jusqu'à maintenant, cependant, aucun de ceux-ci n'a complété avec succès les phases cliniques précoces, à cause principalement des effets secondaires toxiques [593]. De plus, ces études visaient en grande majorité CDK2, que l'on croyait à l'époque essentielle pour des étapes du cycle cellulaire souvent dérégulées dans les cancers. Comme CDK2 n'est pas essentielle pour la division cellulaire normale [602, 603], il est probable qu'elle ne soit pas impliquée dans la prolifération des cellules tumorales. Bref, les données actuelles sont encore insuffisantes pour évaluer avec succès le potentiel thérapeutique des inhibiteurs de CDK.

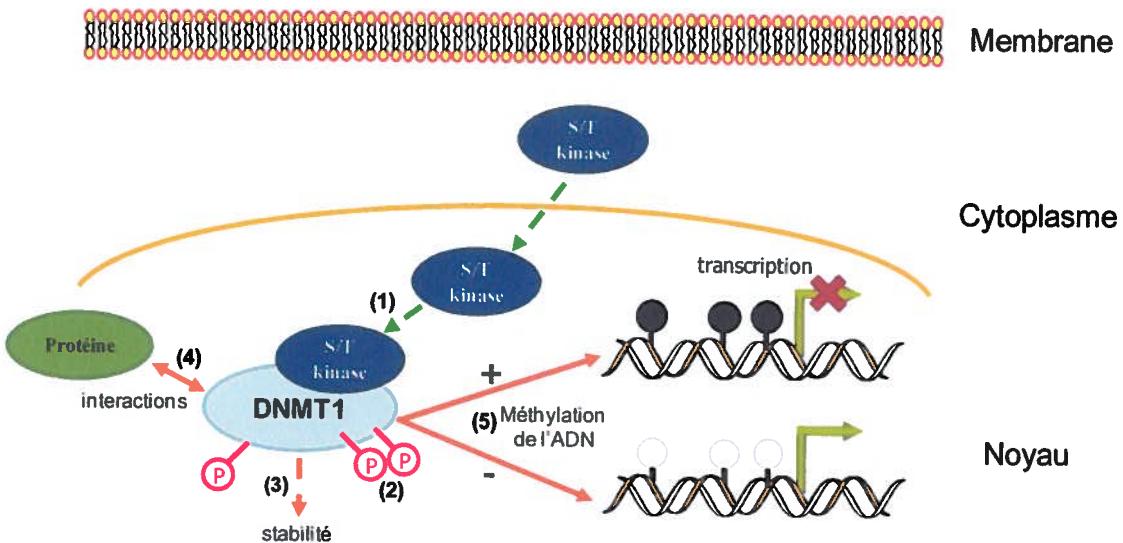
#### 4 Les objectifs généraux de la thèse et modèle d'étude

Comme nous l'avons vu précédemment, DNMT1 est une protéine essentielle dans le développement embryonnaire ainsi qu'au bon maintien de l'intégrité du génome et de l'expression des gènes. Elle est également impliquée dans diverses maladies, dont le cancer. La régulation de DNMT1, ce à tous les niveaux, semble être un processus complexe et encore peu compris. En effet, bien qu'il ait été démontré que DNMT1 est phosphorylée sur une multitude de séries et de thréonines, jusqu'à maintenant, très peu d'études ont été effectuées dans le but d'identifier les kinases responsables et d'en déterminer la relevance fonctionnelle. Étant donné l'importance des effets de la phosphorylation sur les protéines, notamment au niveau de la régulation de l'activité protéique, de la modulation de la localisation cellulaire et des interactions

protéine-protéine, la phosphorylation de DNMT1 pourrait jouer un rôle important dans ces processus.

L'objectif général de mon projet de doctorat consistait à étudier la phosphorylation de la protéine DNMT1 humaine par les sérine/thréonine kinases.

1. L'analyse *in silico* des sites de phosphorylation de la DNMT1 humaine a permis d'établir une liste de kinases candidates. Des fragments protéiques de la DNMT1 fusionnés à la GST et la DNMT1 recombinante ont par la suite servi d'outils afin d'étudier la phosphorylation *in vitro* par les diverses kinases présentées dans le **Tableau VI**. L'ensemble de ces résultats a finalement permis de concentrer mon projet sur deux grandes familles de sérine/thréonine kinases : les PKC et les CDK.
2. Dans un premier temps, nous avons étudié la phosphorylation de DNMT1 par les PKC dans le but de comparer l'habileté des différents isoformes à la phosphoryler. L'utilisation de la PKC $\zeta$  comme modèle a permis d'étudier l'interaction physique et fonctionnelle dans la cellule entre DNMT1 et les PKC.
3. Dans un second temps, nous avons étudié la phosphorylation de DNMT1 par les CDK. Nous avons ensuite identifié un site de phosphorylation situé dans le domaine N-terminal de DNMT1 ciblé par les CDK1, 2 et 5 *in vitro* et *in vivo*. L'importance de ce site de phosphorylation sur l'activité enzymatique et la stabilité de DNMT1 a ensuite été déterminée.
4. Nous avons enfin établi un modèle général d'étude pour la phosphorylation de la DNMT1 par les sérine/thréonine (S/T) kinases (**Figure 11**). Dans le modèle proposé, après translocation au noyau, les S/T kinases, soit les PKC et les CDK, interagiraient avec et phosphoryleraient la DNMT1. La phosphorylation de la DNMT1 par ces kinases sur un ou plusieurs résidu(s) d'acide(s) aminé(s) spécifique(s) l'affecterait par la suite à différents niveaux. Il est possible que la phosphorylation puisse moduler la stabilité de la protéine, affecter les interactions protéine-protéine ou encore augmenter ou diminuer son activité enzymatique. La modification post-traductionnelle de la DNMT1 par la phosphorylation par les PKC et les CDK pourraient enfin aboutir à la modulation de la méthylation du génome et de la transcription des gènes.



**Figure 11.** Modèle d'étude pour la phosphorylation de la DNMT1 humaine par les protéines sérine/thréonine kinases. Dans le modèle proposé, après translocation au noyau, les S/T kinases, soit les PKC et les CDK, interagiraient avec (1) et phosphoryleraient (2) la DNMT1. La phosphorylation de la DNMT1 par ces kinases sur un ou plusieurs résidu(s) d'acide(s) aminé(s) spécifique(s) l'affecterait par la suite à différents niveaux. Il est possible que la phosphorylation puisse moduler la stabilité de DNMT1 (3), affecter les interactions protéine-protéine (4) ou encore augmenter ou diminuer son activité enzymatique (5). La modification post-traductionnelle de la DNMT1 par la phosphorylation par les PKC et les CDK, pourraient enfin aboutir à la modulation de la méthylation du génome et de la transcription des gènes. Cercles noirs, cytosines méthylées; cercles blancs, cytosines non-méthylées.

## **CHAPITRE II**

**PKC isoforms interact with and phosphorylate DNMT1**

Lavoie, G., Estève, P.-O., Bibens Laulan, N., Pradhan, S. and St-Pierre, Y.

Manuscrit publié dans *BMC Biology*, 2011, May 27 9(1):31.

## **CONTRIBUTION DES AUTEURS**

La contribution des auteurs aux figures présentées dans cet article se partage comme suit : j'ai effectué 85% des expériences; la contribution de POE et NBL équivaut à 12% et 3% respectivement. J'ai de plus participé à l'élaboration des approches expérimentales, des protocoles et à la mise au point des expériences ainsi qu'à l'analyse et interprétation des résultats. J'ai aussi rédigé le manuscrit en collaboration avec le Pr. St-Pierre. Le tiré à part de l'article se trouve en annexe 1.

## RÉSUMÉ

Il a été démontré dans la littérature que la méthyltransférase de l'ADN 1 (DNMT1) était phosphorylée sur plusieurs résidus séries et thréonines dans différents types cellulaires et conditions physiologiques. Bien que des études récentes suggèrent l'implication des protéines kinases C dans la phosphorylation de DNMT1, leur contribution individuelle reste à être déterminée. La famille des PKC comprend au moins 10 isoformes qui diffèrent dans leur structure, leurs substrats, leur expression et leur localisation. Dans cette étude, nous avons démontré une phosphorylation préférentielle du domaine N-terminal de la DNMT1 humaine par les PKC $\alpha$ ,  $\beta$ I,  $\beta$ II,  $\delta$ ,  $\gamma$ ,  $\eta$ ,  $\zeta$  et  $\mu$ , tandis que l'isoforme  $\epsilon$  en est incapable. Nous avons ensuite utilisé la PKC $\zeta$  comme modèle afin de démontrer l'existence d'une interaction physique entre cette dernière et DNMT1, de même que sa capacité à phosphoryler cette méthyltransférase de l'ADN. Des études de phosphorylation *in vitro* mettant en jeu des fragments protéiques de la DNMT1 nous ont permis d'observer la phosphorylation préférentielle, par PKC $\zeta$ , des premiers 446 acides aminés de la région N-terminale de DNMT1. L'interaction entre DNMT1 et PKC $\zeta$  a été démontrée par un essai de pull-down GST et par la technique d'immunoprécipitation. Des expériences de colocalisation en microscopie de fluorescence ont aussi montré que DNMT1 et PKC $\zeta$  endogène activée font partie d'un même complexe protéique dans le noyau des cellules. De plus, nous avons détecté la présence d'activité PKC $\zeta$  à partir d'un immunoprécipité de DNMT1 endogène dans les cellules HEK-293. Enfin, suite à la surexpression de DNMT1 et PKC $\zeta$  dans les cellules HEK-293, nous avons constaté une réduction dans le statut de méthylation des gènes à travers le génome, ce qui corrèle avec notre résultat démontrant la réduction de l'activité méthyltransférase de l'ADN de DNMT1 suite à la phosphorylation par la PKC $\zeta$ . L'ensemble de nos résultats indiquent, pour la première fois, que la phosphorylation de la DNMT1 humaine par les PKC est spécifique à certains isoformes et suggèrent une coopération entre DNMT1 et PKC $\zeta$  dans le contrôle des patrons de méthylation du génome.

## Background

DNA methylation plays a critical role in a large variety of cellular processes by controlling gene transcription via gene silencing. Methylation in most animals occurs at the level of cytosines within the sequence CpG, although low levels of non-CpG methylation have been reported in some species. In mammals, there are two classes of DNA (cytosine-5) methyltransferases, *de novo* and maintenance methyltransferases. The *de novo* methyltransferase in mammals has two isoforms, DNMT3a and DNMT3b [1]. The maintenance methyltransferase, DNMT1, is the most prevalent DNA methyltransferase found in cells. DNMT1 has several isoforms, including an oocyte-specific isoform that lacks the first 118 amino acids [2] and a splice variant known as DNMT1b [3]. Maintenance methylation ensures the propagation of tissue-specific methylation patterns established during mammalian development. While the DNMT1 enzymes have a preference for hemimethylated DNA [4], DNMT3a and DNMT3b act on either hemimethylated or unmethylated DNA. Thus, the pattern of mammalian methylation is established and maintained by a set of at least three different DNA methyltransferases.

At present, the signaling cascade by which DNA methylation patterns are imprinted is unclear. Connections between signaling cascades and epigenetic modifications have recently been unraveled by studies showing that the phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/protein kinase B (PKB) signaling pathway regulates the protein level of DNMT1, protecting it from degradation via the ubiquitin-proteasome pathway [5]. The idea that DNMT1 activity could be regulated at the post-translational level through phosphorylation by a serine/threonine kinase was supported by mass spectrometry studies, which reported phosphorylation sites on the serine and threonine residues located in the N-terminal domain [6-15]. This region of DNMT1 fulfills several regulatory functions by interacting with proteins such as LSH, EZH2, UHRF1, G9a, DMAP1 (DNMT-associated proteins), HDAC2 (a histone deacetylase), HP1 $\beta$ , PCNA, and Rb [16-24]. Recently, Hervouet *et al.* (2010) [25] have demonstrated that the disruption of DNMT1/PCNA/UHRF1 interactions promote a global DNA hypomethylation in human gliomas. They also found that such interactions were regulated by the phosphorylation status of DNMT1 since phosphorylation of human DNMT1 by Akt and PKC, at the specific residues serine-127/143 and serine-127 respectively, correlated with global hypomethylation [25].

The protein kinase C (PKC) family consists of ubiquitously expressed phospholipid-dependent serine/threonine kinases, which regulate a large number of physiological processes, including cell growth and differentiation. Studies on simple organisms have shown that PKC signaling paradigms are conserved through evolution from yeast to humans. This conservation underscores the importance of this family in cellular signaling and provides novel insight into PKC function in complex mammalian systems. PKC isoenzymes with differential cellular distribution, substrate specificities, and activation responsiveness are divided into three groups: the conventional PKC isoforms, which are activated by calcium, diacylglycerol, and phorbol esters (cPKCs;  $\alpha$ ,  $\beta$ I,  $\beta$ II and  $\gamma$ ); the novel PKCs, which are activated by diacylglycerol but are calcium-insensitive (nPKCs;  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\eta/L$  (mouse/human) and  $\theta$ ); and the atypical PKCs, which are calcium- and diacylglycerol-insensitive (aPKCs;  $\zeta$  and  $\lambda/\iota$  (mouse/human)) [26]. Although each PKC isoform regulates a large number of downstream targets, individual members of the PKC family are, however, regulated in different ways, and an increasing number of studies indicates that they have distinct, and often opposing, roles [27-29]. In fact, it is now well accepted that each of the PKC isoforms is unique in its contribution to specific biological processes [30, 31]. Whether all PKC isoforms can interact with and phosphorylate DNMT1 remains, however, unknown. Here, we have examined the ability of PKC isoforms to phosphorylate the human DNMT1.

## Results

### *In vitro* phosphorylation of human DNMT1 by PKC isoforms

Previous studies have demonstrated that human DNMT1 is phosphorylated on multiple serine and threonine amino acid residues [6-15]. Experiments using broad spectrum of inhibitors have shown that such phosphorylation on human DNMT1 is dependent on PKC activity [25]. Since PKC family members have contradictory and tissue specific roles, we have compared their ability to phosphorylate human DNMT1. Using an *in vitro* kinase assay, we found that PKC $\alpha$ ,  $\delta$ ,  $\zeta$  and, to a lower extent PKC $\mu$ , were all able to phosphorylate recombinant human DNMT1 in a dose-dependent manner (Figure 1A). No such phosphorylation was observed with PKC $\epsilon$ , although this isoform showed similar activity as compared to other isoforms when tested against a CREB peptide (Figure 1B). Additional evidence of phosphorylation of recombinant full length DNMT1 by a PKC isoform was demonstrated by gel autoradiography using PKC $\zeta$  as a model (Figure 1C).

To further compare the ability of PKC isoforms to phosphorylate DNMT1, a series of GST fusions covering the entire length of DNMT1 were challenged with recombinant PKC isoforms (Figure 2A, B). These fragments have previously been used to elucidate specific interaction between DNMT1 and accessory molecules such as hDNMT3a and hDNMT3b [32], p53 [33] and G9a [23]. Our results showed that all PKC isoforms preferentially phosphorylated the N-terminal domain (amino acids 1–446) of DNMT1 (Figure 2C, D). PKC $\epsilon$  was inefficient in its ability to phosphorylate the N-terminal domain (Figure 2D). Such inability of PKC $\epsilon$  to phosphorylate DNMT1 was not restricted to amino acids 1 to 446 since only negligible phosphorylation of other DNMT1 fragments was observed when compared to the ability of other isoforms (Figure 3). These results were consistent with the preferential binding of PKC $\zeta$ , used here as a prototype model, with the N-terminal domain of DNMT1 (Figure 4A, B). A lower but reproducible binding was also observed between PKC $\zeta$  and the C-terminal domains of DNMT1 encompassing amino acids 1081 to 1409 and 1374 to 1616 (Figure 4C, D).

#### **DNMT1 colocalizes with PKC $\zeta$ *in vivo***

Colocalization experiments were carried out by fluorescent microscopy in DsRed-DNMT1-transfected HeLa cells, which were stained with an antibody specific for the activated form of endogenous PKC $\zeta$ . Red nuclear spots appeared in all of the transfectants, which was consistent with the localization of DNMT1 in the nucleus (Figure 5B, F). Green nuclear spots identifying the endogenous activated form of PKC $\zeta$  were also visible in the nucleus (Figure 5C, G). Superimposition of GFP and DsRed-DNMT1 signals resulted in yellow nuclear spots, demonstrating colocalization of DNMT1 and PKC $\zeta$  (Figure 5D, H). Further evidence of an *in vivo* physical interaction between DNMT1 and PKC was provided by immunoprecipitates of c-myc-PKC $\zeta$  obtained from nuclear extracts and probed by Western blots with anti-DNMT1 antibody. Physical interaction between DNMT1 and PKC $\zeta$  was demonstrated by the presence of DNMT1 in PKC $\zeta$ -c-myc immunoprecipitates (Figure 6A). DNMT1 and PKC $\zeta$  were not detected in control immunoprecipitation experiments using cells transfected with a c-myc expression control vector. Furthermore, endogenous PKC $\zeta$  activity was detected in immunoprecipitates obtained using anti-DNMT1 antibody, but not from immunoprecipitates using an isotypic IgG antibody (Figure 6B). Together, these results confirmed the interaction between DNMT1 and PKC $\zeta$  in HEK-293 cells.

### **Overexpression of PKC $\zeta$ and DNMT1 induces DNA hypomethylation of gene promoters**

A recent study has reported that phosphorylation of DNMT1 is associated with a global DNA hypomethylation and a poor prognosis in gliomas [25]. To determine whether interactions between PKC $\zeta$  and DNMT1 could also induce genome-wide changes in other cell types, the DNA methylation status on broad genomic regions were examined in HEK-293 cells overexpressing PKC $\zeta$  and/or DNMT1, or control cells, including cells treated with the hypomethylating agent 5-aza-2'-deoxycytidine (5-aza-dC) (Figure 7A). For this purpose, genomic DNA was immunoprecipitated with an antibody against 5-methyl-cytosine and hybridized against Affymetrix Promoter 1.0 Tilling Arrays covering 10 to 12.5 kb regions (2.5 Kb 3' and 7.5 to 10 Kb) of 25,500 human gene promoters, with an average tilling resolution of 35 nucleotides. Analysis of the signals generated by such arrays showed an estimated 2,490 methylated regions in HEK-293 cells. Most of the methylated DNA regions identified corresponded to CpG islands (see Additional File 1). In fact, of the 2,490 methylated regions, 2,089 were in CpG islands. Fifteen regions were selected for quantitative analysis of the methylation status by quantitative PCR (qPCR) based on : 1) their distinct position on the chromosomes, 2) the presence of a CpG island within the active region, and 3) their location upstream of a gene known to be regulated by DNA methylation (although this criteria was not exclusive) (Table 1). Methylated DNA query, using specific primers for each gene showed that most, if not all, of the genes analyzed had a significant reduction in their methylation status in cells overexpressing PKC $\zeta$  and DNMT1, but not in cells overexpressing either PKC $\zeta$  or DNMT1 alone (Figure 7B). This reduction in the methylation status was comparable to that observed in cells treated with the hypomethylating agent 5-aza-dC. This decrease in DNA methylation status was observed on 15 genes dispersed on nine different chromosomes. Moreover, all genes, whether harboring low, medium, or high levels of methylated regions, were susceptible to the overexpression of PKC $\zeta$  and DNMT1. Furthermore, *in vitro* phosphorylation of DNMT1 by PKC $\zeta$  strongly reduced its methyltransferase activity (Figure 8), which was consistent with the decrease in DNA methylation observed in cells overexpressing DNMT1 and PKC $\zeta$ .

### **Discussion**

In the present report, we have characterized the relation between PKC isoforms and human DNMT1. More specifically, we found that: 1) PKC $\alpha$ ,  $\beta$ I,  $\beta$ II,  $\delta$ ,  $\gamma$ ,  $\eta$ ,  $\zeta$  and  $\mu$  preferentially

phosphorylate the N-terminal domain of human DNMT1; no such phosphorylation was observed with PKC $\epsilon$ ; 2) PKC $\zeta$  and DNMT1 physically interact *in vivo* in the nucleus of HEK-293 and HeLa cells; 3) PKC $\zeta$  activity could be detected in DNMT1 immunoprecipitates of endogenous DNMT1; and 4) overexpression of PKC $\zeta$  and DNMT1 in HEK-293 cells induces a decrease in DNA methylation, consistent with our results showing that phosphorylation of DNMT1 by PKC $\zeta$  reduces its methyltransferase activity. Overall, these results provide novel insights on the ability of PKC isoforms to play a role in controlling DNA methylation.

In a recent study, the use of broad spectrum inhibitors have suggested that phosphorylation of DNMT1 likely involves Akt and PKC [25]. Here, we provide additional evidence that PKC and DNMT1 physically interact and regulate DNA methylation. Overall, our experiments have shown that most PKC isoforms, including PKC $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\eta$  and  $\zeta$ , are able to phosphorylate, albeit with different efficiency, the N-terminal region of human DNMT1. In fact, the preferential ability of PKC isoforms to interact with and phosphorylate the region encompassing amino acids 1 to 446 are consistent with previous results showing preferential phosphorylation of Serine127 [25]. Interestingly, PKC $\epsilon$  and, to a lesser degree PKC $\mu$ , were inefficient in their ability to phosphorylate DNMT1 or its N-terminal domain. Such differential phosphorylation by PKC has often been observed. For example, phosphorylation of Ser1674 of Ca<sub>v</sub>1.2  $\alpha_{1c}$ , but not Ser1928, is PKC isoform specific, as only PKC $\alpha$ ,  $\beta$ I,  $\beta$ II,  $\gamma$ ,  $\delta$  and  $\theta$ , but not PKC $\epsilon$ ,  $\zeta$  and  $\eta$ , phosphorylate this site [34]. Although it is currently unclear why PKC $\epsilon$  is unable to phosphorylate DNMT1, our observations provide an interesting experimental model to investigate further the functional interaction between PKC isoforms and DNMT1.

PKC participates in a multitude of cellular processes, including differentiation, proliferation, cell cycle progression and tumorigenesis [30, 35]. Increasing evidence has implicated PKC isoforms in nuclear functions, suggesting that they could represent a pathway to communicate to the nucleus signals generated at the plasma membrane [36]. For example, in PC12 cells, PKC $\zeta$  has been found at the inner nuclear matrix of the nucleus [37], where DNA replication gene expression and protein phosphorylation take place [38]. PKC $\zeta$  has also been located in the nucleus of rat H9c2 cells during reoxygenation after ischemic hypoxia [39]. Here we provide further evidence of the presence of activated PKC $\zeta$  in the nucleus of HeLa cells and of HEK-293 cells, indicating that translocation of PKC $\zeta$  into the nucleus is a common mechanism not

restricted to a specific cell type. Our attempts to demonstrate an interaction between endogenous DNMT1 and PKC $\zeta$  by co-immunoprecipitation were, however, unsuccessful, most likely due to low expression level of DNMT1. Using a more sensitive approach, we were able to show PKC $\zeta$ -specific activity in immunoprecipitates of endogenous DNMT1, supporting our hypothesis that endogenous DNMT1 and PKC $\zeta$  could be found in the same complex within the nucleus. This hypothesis is also supported by our data showing that flagged DNMT1 interacts with the endogenous form of PKC $\zeta$ . Whether nuclear PKC $\zeta$  stands in close proximity of DNMT1, ready to act in proliferative cells, is not known. This could be, however, a very effective means to rapidly regulate DNMT1 activity when necessary. A similar paradigm has recently been proposed from studies on the regulation of DNMT1 protein stability through the coordinated interaction of an array of DNMT1-associated proteins, such as UHRF1, Tip60 (Tat-interactive protein) and HAUS (herpes virus-associated ubiquitin specific protease) [40-42].

Given its preferential ability to phosphorylate the N-terminal domain of DNMT1, PKC $\zeta$  may contribute to the formation of multimolecular complexes copying the DNA methylation pattern from a parental to a replicated DNA strand. Several proteins have indeed been reported to interact with DNMT1 via its N-terminal domain, including PCNA, which recruits DNMT1 at the mammalian DNA replication forks [20, 43-45]. Other proteins, such as HDAC and DMAP1 [21] initiate the formation of DNA replication complexes at the replication fork to mediate transcriptional repression. DNMT1 has also been associated with methyl-CpG-binding proteins such as MBD2, MBD3 and MeCP2 to maintain DNA methylation [46, 47]. Histone methyltransferases and HP1 have been recently found to interact with DNMT1, showing a direct connection between the enzymes responsible for DNA methylation and histone methylation [23, 24, 48]. Furthermore, DNMT1 can interact with cell cycle regulating proteins such as Rb and p53 [22, 33, 49]. It is pertinent to note that PKC $\zeta$  has been shown to interact with and to phosphorylate DNA-bound Sp1, thereby causing the release of the repressor p107 on the *Luteinizing Hormone Receptor* gene promoter in TSA-treated MCF-7 cells [50]. Because Sp1 interacts with HDAC1/2/mSin3A on the *Luteinizing Hormone Receptor* gene promoter in both HeLa and MCF-7 cells [51], and HDAC1/2 binds to DNMT1 [22], it is thus possible that PKC $\zeta$  could interact with DNMT1 on the promoter via the Sp1/repressor complex. Additional studies will be required to test these possibilities.

Phosphorylation is one of the most common post-translational modifications occurring in animal cells. The previous observations that human DNMT1 was phosphorylated *in vivo* were indicative that at some point, DNMT1 was interacting with yet unidentified serine/threonine kinases. The results from previous mass spectrometry studies suggested that several phosphorylation sites were targeted depending on the activation status of the cell and/or the cell type [7-15], while Ser154 and Ser714 were shown to be the major phosphorylation sites in HEK-293 cells [8, 12], Ser127, Ser143 and Ser714 in Jurkat cells [13] and Ser143 in lung cancer cells [15]. Although it is unclear at present whether distinct phosphorylation sites are targeted by PKC isoforms in different cell types, it is likely that Ser127 is preferentially targeted [25]. Examination of the phosphorylation profile of human DNMT1 reveals, however, the presence of several alternative phosphosites for PKC isoforms, including some located in the C-terminal regions of DNMT1. Future investigations will be necessary to identify the specific phosphorylation sites in different cell types and different states.

We found that the overexpression of PKC $\zeta$  along with DNMT1 in HEK-293 cells led to a decrease in DNA methylation and that phosphorylation of DNMT1 by PKC $\zeta$  reduced its methyltransferase activity *in vitro*. Our preliminary data indicate that these changes in the methylation status may not, however, be sufficient to induce or modulate gene expression. For example, no significant changes in *Egr1* mRNA expression were observed (data not shown). This may not be surprising because DNA hypomethylation of the promoter does not always result in increased gene expression. Moreover, in cancer cells, although gene-specific hypomethylation occurs, much of the effect of global DNA hypomethylation are thought to occur through the activation of the normally dormant transposons and endogenous retroviruses present in the human genome [52]. The fact that overexpression of PKC $\zeta$  alone was not sufficient to trigger genome hypomethylation may be explained, in part, by the presence of excess of PKC $\zeta$  as compared to endogenous DNMT1. Unbound PKC $\zeta$  might also activate signaling pathways critical for cell proliferation, differentiation and survival, such as the ERK/MAPK pathway, thereby providing a counterbalance to the negative regulation of DNMT1. It is well known that PKC $\zeta$  can activate extracellular signal-regulated kinase/mitogen-activated protein kinase (ERK/MAPK) pathway in different cell types [39, 53, 54]. Moreover, it has been shown that inhibition of ERK/MAPK pathway lead to a decrease in DNA methylation in colon cancer cells [55].

Our data support the idea that PKC-DNMT1 interaction is important in controlling DNA methylation, possibly by regulating DNMT1 interaction with other proteins, such as UHFR1, as recently suggested [25]. This possibility is also supported by data showing that activation of PKC with phorbol ester in mouse hippocampus tissues induced a rapid demethylation of the *reelin* promoter [56]. To date, it was believed that such a role was essentially mediated through the ability of PKC to down-regulate the DNMT expression at the mRNA level [56]. Moreover, Sun *et al.*, [5] have also shown that treatment of HeLa cells with a specific inhibitor of PI3K, which activates PKC, DNMT1 protein level and genomic content of methylated cytosines were decreased in a time-dependent manner without affecting the DNMT1 mRNA level. Whether phosphorylation of DNMT1 on specific residues was involved in maintaining the functional integrity of the enzyme is in fact a real possibility because mutations of one of the major phosphorylation sites of murine DNMT1, Ser515 (previously referred to as Ser514 by Glickman *et al.*, 1997) [6], has been shown to significantly reduce the *in vitro* enzymatic activity of recombinant DNMT1 [57]. Alternatively, phosphorylation of DNMT1 could affect its structural integrity, thereby reducing its DNA-binding activity, as shown by Sugiyama *et al.* via *in vitro* phosphorylation of murine DNMT1 by CK1 $\delta$  [58]. It would thus be very interesting to determine, for instance, whether phosphorylation of DNMT1 modulates its ability to bind specific endogenous DNA sequences, thereby contributing to the overall genome hypomethylation. Ideally, however, such experiments will require antibodies that recognize specific PKC $\zeta$ -mediated phosphorylated residues on human DNMT1. Future investigations will be needed to address this issue.

## Conclusions

This study is the first to identify PKC specific isoforms involved in the phosphorylation of DNMT1. Indeed, all PKC isoforms except PKC $\epsilon$ , which was very inefficient, preferentially phosphorylated the N-terminal domain (amino acids 1 to 446) of DNMT1. Functional implications of DNMT1 phosphorylation by PKC isoforms have been highlighted by experiments using PKC $\zeta$  as a model, which suggested possible roles in the control of DNA methylation patterns of the genome, and possibly in the control of gene expression. Based on the importance of PKC signaling in a multitude of biological processes and of a tight regulation of DNA methylation in normal cells, these findings may provide a novel strategy for cancer therapy.

## Methods

### Cell lines, reagents and constructs

The HEK-293 and the human HeLa cell lines were obtained from the American Type Culture Collection (ATCC) and maintained in Dulbecco's modified Eagle complete medium (DMEM) (supplemented with 10% (v/v) FCS, 2 mmol/L L-glutamine, 10 mmol/L HEPES buffer). All cell culture products were obtained from Life Technologies (Burlington, ON, Canada). All other reagents were purchased from Sigma Chemicals (St. Louis, MO), unless otherwise indicated. To generate pEGFP.PKC $\zeta$  and pMACSK $^k$ .c-myc.PKC $\zeta$  constructs, the PKC $\zeta$  cDNA (kindly provided by Dr. Alex Toker, Department of Pathology, Harvard Medical School, Boston, MA, USA) was amplified by PCR using primers containing internal restriction sites for EcoRI and KpnI (forward primer: GAATTCATGCCAGCAGGACCGACC; reverse primer: GGTACCCACACGGACTCCTCAGC) and XhoI and EcoRI (forward: primer: CTCGAGATGCCAGCAGGACCGACC; reverse primer: GAATTCCACACGGACTCCT-CAGC), respectively. The PCR products were then inserted in PCR4.TOPO (Invitrogen, Burlington, ON, Canada). Following enzymatic digestion with KpnI/EcoRI or XhoI/EcoRI (New England Biolabs, Ipswich, MA), the released fragment (2.12 kb) containing the coding region for PKC $\zeta$  was gel-purified and ligated into pEGFP.N1 (Clontech Laboratories, Mountain View, CA) or pMACSK $^k$ .c-myc (C) (Miltenyi Biotec, Auburn, CA). The resulting pEGFP.PKC $\zeta$  and pMACSK $^k$ .c-myc.PKC $\zeta$  constructs were validated by sequencing and restriction enzyme analyses, as well as by Western blotting following transient transfection in HEK-293 cells. Anti-DNMT1 was obtained from New England Biolabs and the GFP antibody was obtained from Roche Applied Science (Laval, QC, Canada).

### Protein phosphorylation

GST or the fusion proteins bound to glutathione-Sepharose beads were incubated with 50  $\mu$ M ATP, 1  $\mu$ Ci ( $\gamma$ - $^{32}$ P)ATP, kinase buffer (25 mM Tris-HCl (pH 7.5), 5 mM beta-glycerophosphate, 2 mM dithiothreitol (DTT), 0.1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 10 mM MgCl<sub>2</sub>) and 20 nM recombinant activated PKC ( $\alpha$ ,  $\beta$ I,  $\beta$ II,  $\delta$ ,  $\gamma$ ,  $\eta$ ,  $\mu$ ,  $\zeta$  or  $\epsilon$ ) (Cell Signaling Technology, Beverly, MA) at 37°C for 30 minutes. Beads were washed three times, resuspended in scintillation liquid and the phosphate incorporation was then measured. For phosphorylation assays using recombinant DNMT1 or fusion proteins unbound to glutathione-Sepharose, the reactions were applied on P81

phosphocellulose paper squares (Millipore, Billerica, MA) and washed three times with 0.75% phosphoric acid followed by one wash with acetone. Finally, the paper squares were put in scintillation liquid and the phosphate incorporation was measured. Otherwise, the reactions were stopped with the addition of Laemmli buffer and the samples were boiled at 98°C for five minutes. The reaction products were resolved by SDS-PAGE, and  $^{32}\text{P}$  incorporation was analyzed by autoradiography.

### **GST pull-down assay and Western blot analysis**

GST fusion DNMT1 and GST control proteins were expressed in *Escherichia coli* BL21 cells, as described previously [9, 10]. Briefly, following induction with 0.3 mM of isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactoside (IPTG) overnight at 16°C, GST fusion proteins were purified from bacterial crude cell lysates according to the manufacturer's instructions (Pfizer-Pharmacia, New York, NY). Binding assays were performed by pre-incubating the GST or GST fusion DNMT1 proteins beads with 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  bovine serum albumin (BSA) in a binding buffer (50 mM Tris pH 7.5, 28  $\mu\text{M}$  ZnCl<sub>2</sub>, 1% Triton X-100, 220 mM NaCl, 10% glycerol) at 4°C for one hour. The beads were centrifuged, resuspended in binding buffer and incubated with 10 ng of recombinant PKC $\zeta$  at 4°C for one hour. Beads were then washed three times with binding buffer containing 500 mM NaCl. The beads were mixed with 1X SDS-PAGE sample loading buffer (New England Biolabs) and incubated at 98°C for five minutes. The protein mixtures were separated on a 4 to 20% polyacrylamide gel (ISS miniplus SupraGel). The protein bands were blotted onto a nitrocellulose membrane and probed using a PKC $\zeta$  antibody (Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, USA).

### **DNA methylation assay**

DNA methyltransferase assays were carried out at 37°C for the indicated time in duplicate with a total volume of 25  $\mu\text{L}$  of reaction mix, as described previously [4]. Briefly, 20 nM of DNMT1 (New England Biolabs) and 100 ng of PKC $\zeta$  were incubated with or without 50  $\mu\text{M}$  of ATP in the presence of 5  $\mu\text{Ci}$  of *S*-adenosyl-l-(methyl- $^{3}\text{H}$ )methionine (AdoMet) and 50 ng of poly(dI-dC)·poly(dI-dC) in methyltransferase buffer (50 mM Tris-HCL, pH 7.8, 1 mM Na<sub>2</sub>EDTA, pH 8.0, 1 mM DTT, 7  $\mu\text{g}/\text{ml}$  phenylmethylsulfonyl fluoride, 5% glycerol) supplemented with 5  $\mu\text{g}$  of phosphatidylserine and 5 mM MgCl<sub>2</sub> to allow PKC $\zeta$  activity. The reactions were stopped by transferring the tubes to an ethanol/dry ice bath, spotted on a DE81

membrane (Millipore) and processed as described previously [4].

### **Immunofluorescence analysis**

HeLa cells were transfected with 3 µg of DsRed-DNMT1 plasmid using Lipofectamine 2000. After 48 hours, the cells were washed with cold PBS and fixed with 4% paraformaldehyde in PBS. The cells were then permeabilized with 0.2% Triton X-100 in PBS. For endogenous phosphorylated-PKC $\zeta$  labeling, the cells were first incubated overnight at 4°C with a blocking solution (BSA 5% in PBS-Tween). Antibody against phosphorylated-PKC $\zeta$  (Cell Signaling Technology, Beverly, MA) was then added and incubated overnight. After several washes with PBS-Tween, the cells were incubated with an anti-rabbit secondary antibody coupled with GFP for 1 hour at room temperature and then with Hoechst 33342. Cells were dried, fixed and visualized with a Zeiss 200 M microscope (Carl Zeiss Microimaging, Thornwood, NY) with a 63x oil objective lens at 488 nm for GFP-phosphorylated-PKC $\zeta$ , 568 nm for DsRed-DNMT1 fusion, and 460 nm for nuclear staining with Hoechst 33342.

### **Co-immunoprecipitation**

HEK-293 cells were seeded in 100 mm dish the day before transfection at a density of  $2 \times 10^6$  cells/dish. Cells were transfected with pCDNA4.DNMT1 in combination with pMACSK<sup>k</sup>.c-myc.PKC $\zeta$  or pMACSK<sup>k</sup>.c-myc. After 48 hours, the cells were harvested and nuclear proteins were extracted with the CelLytic NuCLEAR extraction kit. Equal amounts of nuclear lysates (500 µg) (as determined by the Bradford protein assay) and the Profound c-myc tag co-IP kit (Pierce, Rockford, IL) were used to purify c-myc-tagged PKC $\zeta$ , following the manufacturer's instructions. Briefly, nuclear protein extracts were incubated with 10 µl of immobilized anti-c-myc beads with end-over-end mixing for two hours at 4°C. Complexes were washed with TBS several times and c-myc-tagged proteins were eluted with reducing sample buffer. Western blot analysis was then performed using an anti-c-myc antibody (Miltenyi Biotec) to detect c-myc.PKC $\zeta$ , an anti-DNMT1 antibody to reveal DNMT1 and an anti-β-actin to detect the loading control actin.

### **Western blot analysis**

Cells were washed with PBS and homogenized on ice in lysis buffer (50 mM Tris pH 7.4, 150 mM NaCl, 25% glycerol, 1% Triton X-100) supplemented with a cocktail of protease

inhibitors and fresh PMSF (0.5 mM) and DTT (1 mM). Equal amounts of cell lysates (as determined by Bio-Rad protein assay) were separated onto an 8% SDS-PAGE gel and transferred onto nitrocellulose membranes (Bio-Rad Laboratories, Mississauga, ON, Canada). The membranes were blocked with 5% milk in PBS/0.05% Tween-20 overnight at 4°C and then probed for two hours at room temperature with primary antibody diluted 1:5000 in PBS/0.05% Tween-20/5% milk. After several washes in PBS/0.05% Tween-20, membranes were probed with a horseradish peroxidase conjugated anti-mouse or anti-rabbit secondary antibody (Amersham Biosciences, Baie d'Urfé, QC, Canada) diluted 1:10,000 in PBS/0.05% Tween-20/5% milk for one hour at room temperature, followed by several washes in PBS/0.05% Tween-20. Detection was performed using the enhanced chemiluminescence method (Amersham Biosciences).

### **Immunoprecipitation and *in vitro* kinase assay**

HEK-293 cells were harvested at confluence and nuclear proteins were extracted. Antibodies against DNMT1 or PKC $\zeta$ , or an isotypic IgG antibody, prebound to protein G beads (Invitrogen) were incubated with nuclear proteins in presence of protease inhibitors (at 4°C) on an orbital shaker for four hours. Proteins bound to beads were washed three times with phosphate buffer and resuspended in kinase buffer. The *in vitro* kinase assay was carried out as described earlier.

### **Methylated DNA IP-on-Chip**

DNA was isolated by incubating cells overnight at 50°C in SDS/proteinase K digestion buffer. Lysates were sonicated to shear the DNA to an average length of 300 to 500 bp. DNA was extracted with phenol/chloroform followed by ethanol precipitation, and then further treated with RNase and proteinase K and again ethanol-precipitated. Pellets were resuspended and the resulting DNA was quantified on a Nanodrop spectrophotometer. An aliquot of DNA (20 µg) was precleared with protein G agarose beads (Invitrogen). Methylated DNA was detected using an antibody against 5-methyl-cytosine (Abcam ab1884, San Diego, CA). After incubation at 4°C overnight, protein G agarose beads were used to isolate the immune complexes. Complexes were washed and eluted from the beads with SDS buffer. Immunoprecipitated DNA was purified by phenol/chloroform extraction and ethanol precipitation. Quantitative PCR (qPCR) reactions were carried out in triplicate on specific genomic regions using SYBR Green Supermix (Bio-Rad). The resulting signals were normalized for primer efficiency by carrying out qPCR for each primer pair using Input DNA. Immunoprecipitated and Input DNAs were amplified using either random

priming or whole-genome amplification (WGA). For random priming, a fixed sequence of 17 bases containing 9 random bases at the 3' end was used in four linear amplification reactions with Sequenase (USB). Following purification, the randomly primed ChIP DNA was amplified for 30 cycles using a fixed sequence primer. For WGA, the GenomePlex WGA Kit (Sigma-Aldrich, St.Louis, MO) was used. The resulting amplified DNA was purified, quantified, and tested by qPCR at the same genomic regions as the original immunoprecipitated DNA to assess the quality of the amplification reactions. The amplified DNA was digested and labeled using the DNA Terminal Labeling Kit (Affymetrix, Fremont, CA), and then hybridized to Affymetrix GeneChip Human Promoter 1.0R arrays at 45°C overnight. Arrays were washed and scanned, and the resulting CEL files were analyzed using the Affymetrix TAS software. Thresholds were set, and the resulting BED files were analyzed using Genpathway IP (San Diego, CA, USA) analysis software, which provides comprehensive information on genomic annotation, peak metrics and sample comparisons for all peaks (intervals).

### **Methylated DNA Query**

Immunoprecipitated DNA was quantified at specific regions using qPCR as described above. Experimental  $C_t$  values were converted to copy numbers detected by comparison with a DNA standard curve run on the same PCR plates. Copy number values were then normalized for primer efficiency by dividing by the values obtained using input DNA and the same primer pairs. Error bars represent standard deviations calculated from the triplicate determinations.

### **Statistical analysis**

Student's *t* test was used when comparing two means. The level of significance was determined at  $P < 0.05$ .

### **Abbreviations**

ATCC, American Type Culture Collection; 5-aza-dC, 5-aza-2'-deoxycytidine; CK1 $\delta$ , casein kinase 1 $\delta$ ; CREB, cyclic AMP response element-binding protein; DNMT1, DNA methyltransferase 1; DMAP1, DNA methyltransferase 1-associated protein 1; DTT, dithiothreitol; Egr1, early growth response protein 1; ERK, extracellular signal-regulated kinase; EZH2, enhancer of zeste homolog 2; GST, glutathione S-transferase; HAUS, herpes virus-associated ubiquitin specific protease; HDAC1/2, histone deacetylase 1 and 2; HEPES, 4-(2-

hydroxyethyl)-1-piperazinethanesulfonic acid; HP1, heterochromatin protein 1; IPTG, isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactoside; LSH, lymphoid-specific helicase; MAPK, mitogen-activated protein kinase; MBD, methyl-CpG-binding domain; MeCP2, methyl-CpG-binding protein 2; PCNA, proliferating cell nuclear antigen; PI3K, phosphatidylinositol 3-kinase; PKB, protein kinase B; PKC, protein kinase C; PMSF, phenylmethylsulfonyl fluoride; Rb, Retinoblastoma protein; Sp1, specificity protein 1; Tip60, tat interactive protein-60; TSA, trichostatin A; UHRF1, ubiquitin-like with PHD and ring finger domains 1; WGA, whole-genome amplification.

### **Authors' contributions**

GL, POE, SP and YSP designed the research and analysed the data. GL, POE and NBL performed the research. GL and YSP wrote the paper. All authors read and approved the final manuscript.

### **Competing interests**

The authors declare no competing financial interests.

### **Acknowledgements**

The authors thank Dr. Alex Toker for kindly providing vectors, Doris Legault, Diane Tremblay, Mary Harper, and Paul Labhart for their technical support, and Dr. Edouard F. Potworowski for critical reading of the manuscript. This research was supported by a grant from the National Sciences and Engineering Research Council of Canada. GL is supported by a studentship from the Canadian Institute for Health Research of Canada.

### **References**

1. Okano M, Bell DW, Haber DA, Li E: **DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for *de novo* methylation and mammalian development.** *Cell* 1999, **99**:247-257.
2. Mertineit C, Yoder JA, Taketo T, Laird DW, Trasler JM, Bestor TH: **Sex-specific exons control DNA methyltransferase in mammalian germ cells.** *Development* 1998, **125**:889-897.

3. Bonfils C, Beaulieu N, Chan E, Cotton-Montpetit J, MacLeod AR: **Characterization of the human DNA methyltransferase splice variant Dnmt1b.** *J Biol Chem* 2000, **275**:10754-10760.
4. Pradhan S, Bacolla A, Wells RD, Roberts RJ: **Recombinant human DNA (cytosine-5) methyltransferase. I. Expression, purification, and comparison of de novo and maintenance methylation.** *J Biol Chem* 1999, **274**:33002-33010.
5. Sun L, Zhao H, Xu Z, Liu Q, Liang Y, Wang L, Cai X, Zhang L, Hu L, Wang G, Zha X: **Phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B pathway stabilizes DNA methyltransferase I protein and maintains DNA methylation.** *Cell Signal* 2007, **19**:2255-2263.
6. Glickman JF, Pavlovich JG, Reich NO: **Peptide mapping of the murine DNA methyltransferase reveals a major phosphorylation site and the start of translation.** *J Biol Chem* 1997, **272**:17851-17857.
7. Beausoleil SA, Jedrychowski M, Schwartz D, Elias JE, Villen J, Li J, Cohn MA, Cantley LC, Gygi SP: **Large-scale characterization of HeLa cell nuclear phosphoproteins.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004, **101**:12130-12135.
8. Molina H, Horn DM, Tang N, Mathivanan S, Pandey A: **Global proteomic profiling of phosphopeptides using electron transfer dissociation tandem mass spectrometry.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007, **104**:2199-2204.
9. Olsen JV, Blagoev B, Gnad F, Macek B, Kumar C, Mortensen P, Mann M: **Global, *in vivo*, and site-specific phosphorylation dynamics in signaling networks.** *Cell* 2006, **127**:635-648.
10. Dephoure N, Zhou C, Villen J, Beausoleil SA, Bakalarski CE, Elledge SJ, Gygi SP: **A quantitative atlas of mitotic phosphorylation.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008, **105**:10762-10767.
11. Cantin GT, Yi W, Lu B, Park SK, Xu T, Lee JD, Yates JR 3rd: **Combining protein-based IMAC, peptide-based IMAC, and MudPIT for efficient phosphoproteomic analysis.** *J Proteome Res* 2008, **7**:1346-1351.
12. Gauci S, Helbig AO, Slijper M, Krijgsveld J, Heck AJ, Mohammed S: **Lys-N and trypsin cover complementary parts of the phosphoproteome in a refined SCX-based approach.** *Anal Chem* 2009, **81**:4493-4501.

13. Mayya V, Lundgren DH, Hwang SI, Rezaul K, Wu L, Eng JK, Rodionov V, Han DK: **Quantitative phosphoproteomic analysis of T cell receptor signaling reveals system-wide modulation of protein-protein interactions.** *Sci Signal* 2009, **2**:ra46.
14. Chen RQ, Yang QK, Lu BW, Yi W, Cantin G, Chen YL, Fearn C, Yates JR, 3rd, Lee JD: **CDC25B mediates rapamycin-induced oncogenic responses in cancer cells.** *Cancer Res* 2009, **69**:2663-2668.
15. Tsai CF, Wang YT, Chen YR, Lai CY, Lin PY, Pan KT, Chen JY, Khoo KH, Chen YJ: **Immobilized metal affinity chromatography revisited: pH/acid control toward high selectivity in phosphoproteomics.** *J Proteome Res* 2008, **7**:4058-4069.
16. Myant K, Stancheva I: **LSH cooperates with DNA methyltransferases to repress transcription.** *Mol Cell Biol* 2008, **28**:215-226.
17. Bostick M, Kim JK, Esteve PO, Clark A, Pradhan S, Jacobsen SE: **UHRF1 plays a role in maintaining DNA methylation in mammalian cells.** *Science* 2007, **317**:1760-1764.
18. Vire E, Brenner C, Deplus R, Blanchon L, Fraga M, Didelot C, Morey L, Van Eynde A, Bernard D, Vanderwinden JM, Bollen M, Esteller M, Di Croce L, de Launoit Y, Fuks F: **The Polycomb group protein EZH2 directly controls DNA methylation.** *Nature* 2006, **439**:871-874.
19. Sharif J, Muto M, Takebayashi S, Suetake I, Iwamatsu A, Endo TA, Shinga J, Mizutani-Koseki Y, Toyoda T, Okamura K, Tajima S, Mitsuya K, Okano M, Koseki H: **The SRA protein Np95 mediates epigenetic inheritance by recruiting Dnmt1 to methylated DNA.** *Nature* 2007, **450**:908-912.
20. Chuang LS, Ian HI, Koh TW, Ng HH, Xu G, Li BF: **Human DNA-(cytosine-5) methyltransferase-PCNA complex as a target for p21WAF1.** *Science* 1997, **277**:1996-2000.
21. Rountree MR, Bachman KE, Baylin SB: **DNMT1 binds HDAC2 and a new co-repressor, DMAP1, to form a complex at replication foci.** *Nat Genet* 2000, **25**:269-277.
22. Robertson KD, Ait-Si-Ali S, Yokochi T, Wade PA, Jones PL, Wolffe AP: **DNMT1 forms a complex with Rb, E2F1 and HDAC1 and represses transcription from E2F-responsive promoters.** *Nat Genet* 2000, **25**:338-342.

23. Esteve PO, Chin HG, Smallwood A, Feehery GR, Gangisetty O, Karpf AR, Carey MF, Pradhan S: **Direct interaction between DNMT1 and G9a coordinates DNA and histone methylation during replication.** *Genes Dev* 2006, **20**:3089-3103.
24. Smallwood A, Esteve PO, Pradhan S, Carey M: **Functional cooperation between HP1 and DNMT1 mediates gene silencing.** *Genes Dev* 2007, **21**:1169-1178.
25. Hervouet E, Lalier L, Debien E, Cheray M, Geairon A, Rogniaux H, Loussouarn D, Martin SA, Vallette FM, Cartron PF: **Disruption of Dnmt1/PCNA/UHRF1 interactions promotes tumorigenesis from human and mice glial cells.** *PLoS ONE* 2010, **5**:e11333.
26. Jaken S: **Protein kinase C isozymes and substrates.** *Curr Opin Cell Biol* 1996, **8**:168-173.
27. Mischak H, Goodnight JA, Kolch W, Martiny-Baron G, Schaechtle C, Kazanietz MG, Blumberg PM, Pierce JH, Mushinski JF: **Overexpression of protein kinase C-delta and -epsilon in NIH 3T3 cells induces opposite effects on growth, morphology, anchorage dependence, and tumorigenicity.** *J Biol Chem* 1993, **268**:6090-6096.
28. Chen L, Hahn H, Wu G, Chen CH, Liron T, Schechtman D, Cavallaro G, Banci L, Guo Y, Bolli R, Dorn GW 2<sup>nd</sup>, Mochly-Rosen D: **Opposing cardioprotective actions and parallel hypertrophic effects of delta PKC and epsilon PKC.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001, **98**:11114-11119.
29. Fahrmann M, Kaufhold M, Rieg T, Seidler U: **Different actions of protein kinase C isoforms alpha and epsilon on gastric acid secretion.** *Br J Pharmacol* 2002, **136**:938-946.
30. Dempsey EC, Newton AC, Mochly-Rosen D, Fields AP, Reyland ME, Insel PA, Messing RO: **Protein kinase C isozymes and the regulation of diverse cell responses.** *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2000, **279**:L429-438.
31. Steinberg SF: **Structural basis of protein kinase C isoform function.** *Physiol Rev* 2008, **88**:1341-1378.
32. Kim GD, Ni J, Kelesoglu N, Roberts RJ, Pradhan S: **Co-operation and communication between the human maintenance and de novo DNA (cytosine-5) methyltransferases.** *EMBO J* 2002, **21**:4183-4195.

33. Esteve PO, Chin HG, Pradhan S: Human maintenance DNA (cytosine-5)-methyltransferase and p53 modulate expression of p53-repressed promoters. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005, **102**:1000-1005.
34. Yang L, Doshi D, Morrow J, Katchman A, Chen X, Marx SO: Protein kinase C isoforms differentially phosphorylate Ca(v)1.2 alpha(1c). *Biochemistry* 2009, **48**:6674-6683.
35. Musashi M, Ota S, Shiroshita N: The role of protein kinase C isoforms in cell proliferation and apoptosis. *Int J Hematol* 2000, **72**:12-19.
36. Martelli AM, Sang N, Borgatti P, Capitani S, Neri LM: Multiple biological responses activated by nuclear protein kinase C. *J Cell Biochem* 1999, **74**:499-521.
37. Zhou G, Seibenhener ML, Wooten MW: Nucleolin is a protein kinase C-zeta substrate. Connection between cell surface signaling and nucleus in PC12 cells. *J Biol Chem* 1997, **272**:31130-31137.
38. Berezney R: Regulating the mammalian genome: the role of nuclear architecture. *Adv Enzyme Regul* 2002, **42**:39-52.
39. Mizukami Y, Kobayashi S, Uberall F, Hellbert K, Kobayashi N, Yoshida K: Nuclear mitogen-activated protein kinase activation by protein kinase czeta during reoxygenation after ischemic hypoxia. *J Biol Chem* 2000, **275**:19921-19927.
40. Achour M, Fuhrmann G, Alhosin M, Ronde P, Chataigneau T, Mousli M, Schini-Kerth VB, Bronner C: UHRF1 recruits the histone acetyltransferase Tip60 and controls its expression and activity. *Biochem Biophys Res Commun* 2009, **390**:523-528.
41. Du Z, Song J, Wang Y, Zhao Y, Guda K, Yang S, Kao HY, Xu Y, Willis J, Markowitz SD, Sedwick D, Weing RM, Wang Z: DNMT1 stability is regulated by proteins coordinating deubiquitination and acetylation-driven ubiquitination. *Sci Signal* 2010, **3**(146):ra80.
42. Bronner C: Control of DNMT1 abundance in epigenetic inheritance by acetylation, ubiquitylation, and the histone code. *Sci Signal* 2011, **4**(157):pe3.
43. Leonhardt H, Page AW, Weier HU, Bestor TH: A targeting sequence directs DNA methyltransferase to sites of DNA replication in mammalian nuclei. *Cell* 1992, **71**:865-873.

44. Liu Y, Oakeley EJ, Sun L, Jost JP: **Multiple domains are involved in the targeting of the mouse DNA methyltransferase to the DNA replication foci.** *Nucleic Acids Res* 1998, **26**:1038-1045.
45. Vertino PM, Sekowski JA, Coll JM, Applegren N, Han S, Hickey RJ, Malkas LH: **DNMT1 is a component of a multiprotein DNA replication complex.** *Cell Cycle* 2002, **1**:416-423.
46. Tatematsu KI, Yamazaki T, Ishikawa F: **MBD2-MBD3 complex binds to hemi-methylated DNA and forms a complex containing DNMT1 at the replication foci in late S phase.** *Genes Cells* 2000, **5**:677-688.
47. Kimura H, Shiota K: **Methyl-CpG-binding protein, MeCP2, is a target molecule for maintenance DNA methyltransferase, Dnmt1.** *J Biol Chem* 2003, **278**:4806-4812.
48. Fuks F, Hurd PJ, Deplus R, Kouzarides T: **The DNA methyltransferases associate with HP1 and the SUV39H1 histone methyltransferase.** *Nucleic Acids Res* 2003, **31**:2305-2312.
49. Pradhan S, Kim GD: **The retinoblastoma gene product interacts with maintenance human DNA (cytosine-5) methyltransferase and modulates its activity.** *Embo J* 2002, **21**:779-788.
50. Zhang Y, Liao M, Dufau ML: **Phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase Czeta-induced phosphorylation of Sp1 and p107 repressor release have a critical role in histone deacetylase inhibitor-mediated derepression [corrected] of transcription of the luteinizing hormone receptor gene.** *Mol Cell Biol* 2006, **26**:6748-6761.
51. Liao M, Zhang Y, Dufau ML: **Protein kinase Calpha-induced derepression of the human luteinizing hormone receptor gene transcription through ERK-mediated release of HDAC1/Sin3A repressor complex from Sp1 sites.** *Mol Endocrinol* 2008, **22**:1449-1463.
52. Wilson AS, Power BE, Molloy PL: **DNA hypomethylation and human diseases.** *Biochim Biophys Acta* 2007, **1775**:138-162.
53. Zhao Y, Liu J, Li L, Liu L, Wu L: **Role of Ras/PKCzeta/MEK/ERK1/2 signaling pathway in angiotensin II-induced vascular smooth muscle cell proliferation.** *Regul Pept* 2005, **128**:43-50.

54. Yang CS, Lee JS, Song CH, Hur GM, Lee SJ, Tanaka S, Akira S, Paik TH, Jo EK: **Protein kinase C zeta plays an essential role for Mycobacterium tuberculosis-induced extracellular signal-regulated kinase 1/2 activation in monocytes/macrophages via Toll-like receptor 2.** *Cell Microbiol* 2007, **9**:382-396.
55. Lu R, Wang X, Chen ZF, Sun DF, Tian XQ, Fang JY: **Inhibition of the extracellular signal-regulated kinase/mitogen-activated protein kinase pathway decreases DNA methylation in colon cancer cells.** *J Biol Chem* 2007, **282**:12249-12259.
56. Levenson JM, Roth TL, Lubin FD, Miller CA, Huang IC, Desai P, Malone LM, Sweatt JD: **Evidence that DNA (cytosine-5) methyltransferase regulates synaptic plasticity in the hippocampus.** *J Biol Chem* 2006, **281**:15763-15773.
57. Goyal R, Rathert P, Laser H, Gowher H, Jeltsch A: **Phosphorylation of serine-515 activates the Mammalian maintenance methyltransferase Dnmt1.** *Epigenetics* 2007, **2**:155-160.
58. Sugiyama Y, Hatano N, Sueyoshi N, Suetake I, Tajima S, Kinoshita E, Kinoshita-Kikuta E, Koike T, Kameshita I: **The DNA-binding activity of mouse DNA methyltransferase 1 is regulated by phosphorylation with casein kinase 1delta/epsilon.** *Biochem J* 2010, **427**:489-497.

## Figure legends

**Figure 1. PKC isoforms phosphorylate human recombinant DNMT1.** (A) Quantitative measurements of phosphorylation of 5 nM of DNMT1 in the presence of ( $\gamma$ -<sup>32</sup>P)ATP for 30 minutes at 30°C with the indicated amounts of activated recombinant human PKC $\alpha$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\mu$  or  $\zeta$ . DNMT1 phosphorylation was quantified as the ratio of PKC activity to negative control. Data represent the average of two representative independent experiments. Bars, S.D. (B) PKC activity of recombinant PKC isoforms against CREB, showing that all isoforms were active. 20 nM of each PKC and 1.5  $\mu$ M of CREB peptides were used for the assay and were incubated in the presence of ( $\gamma$ -<sup>32</sup>P)ATP for 30 minutes at 30°C. Bars, S.D. (C) Autoradiography of a SDS-PAGE showing incorporation ( $\gamma$ -<sup>32</sup>P)ATP in recombinant human DNMT1 following incubation with different amounts of human PKC $\zeta$ .

**Figure 2. PKC isoforms preferentially phosphorylate DNMT1 N-terminal domain.** (A) Diagram of DNMT1 showing the corresponding regions of the GST fusion DNMT1 fragments used for phosphorylation assays. Methylation DNA-dependent allosteric activation (MDDAAD), bromo domain (BD), and nuclear localization sequences (NLS) of DNMT1 are indicated. (B) Coomassie-stained gel representing GST fusion DNMT1 proteins used for phosphorylation assays. Positions of the fusion fragments are marked with an asterisk. (C) Phosphorylation of GST fusion DNMT1 fragments following incubation with 20 nM of activated recombinant PKC $\alpha$ ,  $\beta$ I,  $\beta$ II,  $\gamma$ ,  $\delta$  or  $\eta$  using ( $\gamma$ -<sup>32</sup>P)ATP. Counts were obtained following subtraction of the negative control (GST alone). Data are representative of three independent experiments. (D) Phosphorylation of the GST fusion DNMT1 fragment 1 to 446 following incubation with 20 nM of activated recombinant PKC $\alpha$ ,  $\beta$ I,  $\beta$ II,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\eta$ ,  $\mu$  or  $\zeta$  using ( $\gamma$ -<sup>32</sup>P)ATP. Counts were obtained following subtraction of the negative control (GST alone). Data represent the average of three representative independent experiments. Bars, S.D.

**Figure 3. PKC $\epsilon$  does not phosphorylate individual domains of DNMT1.** Incorporation of ( $\gamma$ - $^{32}$ P)ATP by GST fusion DNMT1 fragments following incubation with 20 nM of activated recombinant PKC $\zeta$ , PKC $\mu$  or PKC $\epsilon$ . Counts were obtained following subtraction of the negative control (GST alone). Data are representative of three independent experiments.

**Figure 4. PKC $\zeta$  interacts with and phosphorylates DNMT1 fragments.** (A) Binding of PKC $\zeta$  to GST fusion DNMT1 fragments using the pull-down procedure described in Materials and methods. Input, 10 ng of recombinant PKC $\zeta$ . (B) Ponceau-stained transferred proteins from pull-down experiments. Positions of the fusion proteins are marked with an asterisk. (C) Phosphorylation of GST fusion DNMT1 fragments bound and (D) unbound to beads following incubation with 20 nM of activated recombinant PKC $\zeta$  using ( $\gamma$ - $^{32}$ P)ATP. Counts were obtained following subtraction of the negative control (GST alone). Data are representative of three independent experiments. Bars, S.D.

**Figure 5. DNMT1 and PKC $\zeta$  colocalize in the nucleus of HeLa cells.** HeLa cells are shown with phase contrast (A), DsRed.DNMT1 (red) (B), GFP-phosphorylated-PKC $\zeta$  (green) (C), DsRed.DNMT1 and GFP-phosphorylated-PKC $\zeta$  (merged yellow) (D), nucleus (blue) (E), merge nucleus and DsRed.DNMT1 (F), merge nucleus and GFP-phosphorylated-PKC $\zeta$  (G), merge nucleus, DsRed.DNMT1, and GFP-phosphorylated-PKC $\zeta$  (H). The construct DsRed.DNMT1 was transfected in HeLa cells 48 hours before cells fixation and permeabilization. An anti-phosphorylated-PKC $\zeta$  rabbit antibody was used in combination with an anti-rabbit antibody coupled with GFP to detect endogenous activated form of PKC $\zeta$ .

**Figure 6. *In vivo* association between DNMT1 and PKC $\zeta$ .** (A) Co-immunoprecipitation of DNMT1 and PKC $\zeta$  in nuclear extracts of HEK-293 cells. The cells were transfected with DNMT1 and PKC $\zeta$ -c-myc or c-myc for 48 hours and c-myc proteins were purified with immobilized anti-c-myc beads. Protein complexes were resolved by SDS/PAGE and the presence of PKC $\zeta$  was demonstrated using an anti-c-myc antibody; DNMT1 and actin were revealed,

respectively, using an anti-DNMT1 and an anti-actin antibody. (B) Detection of endogenous PKC $\zeta$  activity in DNMT1 immunoprecipitates. Nuclear proteins from HEK-293 cells were incubated with beads prebound to an isotopic IgG antibody or antibodies against DNMT1 or PKC $\zeta$  for 4 hours. After several washes, protein-bead complexes were tested for kinase activity using ( $\gamma$ - $^{32}$ P)ATP and PKC $\zeta$  specific substrate. Data are representative of three independent experiments. rec. PKC $\zeta$ , recombinant PKC $\zeta$ .

**Figure 7. Decrease of DNA methylation in HEK-293 cells overexpressing DNMT1 and PKC $\zeta$ .** (A) Western blot analysis showing expression of PKC $\zeta$  and DNMT1 in HEK-293 transfected cells used in the analysis of methylated DNA Ip-on-Chip described in Materials and methods. (B) Histograms representing the methylation status of 15 genes selected from active regions as measured by qPCR using DNA immunoprecipitated with an antibody against 5-methylcytosine. Untr12 was used as a control for a negative region. TRPA1 was used as a positive control. Copy number values were normalized for primer efficiency by dividing by the values obtained using input DNA and the same primer pairs. Error bars represent standard deviations calculated from the triplicate determinations. \*,  $P < 0.05$ ; \*\*,  $P < 0.01$ .

**Figure 8. Phosphorylation of DNMT1 by PKC $\zeta$  reduces its methyltransferase activity.** Quantitative measurements of S-adenosyl-l-(methyl- $^{3}$ H)methionine integration in a DNA matrix poly(dI-dC).poly(dI-dC) by 20 nM of recombinant DNMT1 in the presence 100 ng of recombinant PKC $\zeta$  incubated with or without 50  $\mu$ M of ATP for different times. Data are representative of three independent experiments. Bars, S.D.

**Table****Table 1. List of identified genes selected among active regions**

Gene	GeneBa nk	Ch r #	Position of active regions	# Length h	of CpG islands	Gene description
				(bp)		
<b>TAS1R3</b>	XM_37	1	1304459 to 1305587	1,128	1	taste receptor, type 1, member 3
<b>PRKCZ</b>	NM_002744	1	2143904 to 2144365	461	0	PKC, zeta
<b>TP73</b>	NM_005427	1	3582480 to 3584936	2,456	1	tumor protein p73
<b>SMYD3</b>	NM_022743	1	242463744 to 242466254	2,510	1	SET and MYND domain containing 3
<b>EGR1</b>	NM_001964	5	137830566 to 137831545	979	1	early growth response 1
<b>TRPA1</b>	NM_007332	8	73149159 to 73150095	936	1	transient receptor potential cation channel, subfamily A, member 1
<b>B4GALNT4</b>	NM_178537	11	352950 to 353975	1,025	0	beta1,4-N-acetylgalactosaminyltransferases IV
<b>SCT</b>	NM_021920	11	617138 to 618042	904	1	secretin
<b>DDIT3</b>	NM_004083	12	56201552 to 56202131	579	0	DNA-damage-inducible transcript 3

<b>MMP17</b>	NM_01	12	130978656	780	1	matrix metalloproteinase 17
	6155		to			
			130979436			
<b>MMP15</b>	NM_00	16	56617452	285	1	matrix metalloproteinase 15
	2428		to 5661737			
<b>PRKCA</b>	NM_00	17	61729105	607	1	PKC, alpha
	2737		to			
			61729712			
<b>CD7</b>	NM_00	17	77870114	1,103	1	CD7 antigen (p41)
	6137		to			
			77871217			
<b>LGAL7</b>	NM_00	19	43973066	1,050	1	Galectin-7
	2307		to			
			43974116			
<b>MMP11</b>	NM_00	22	22439567	394	1	matrix metalloproteinase 11
	5940		to			
			22439961			
<b>TIMP3</b>	NM_00	22	31518100	535	0	tissue inhibitor of
	0362		to			
			31518635			metalloproteinase 3

## **Additional files**

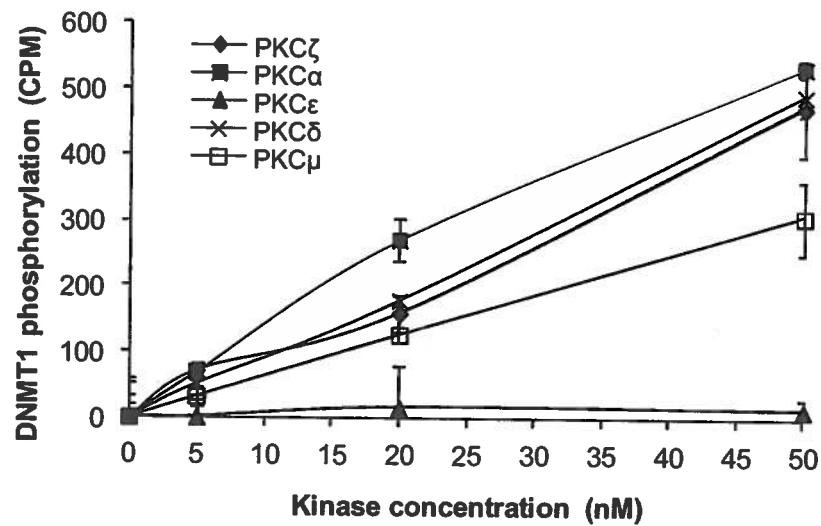
### **Additional file 1.**

**Title:** ChIP-on-Chip results.

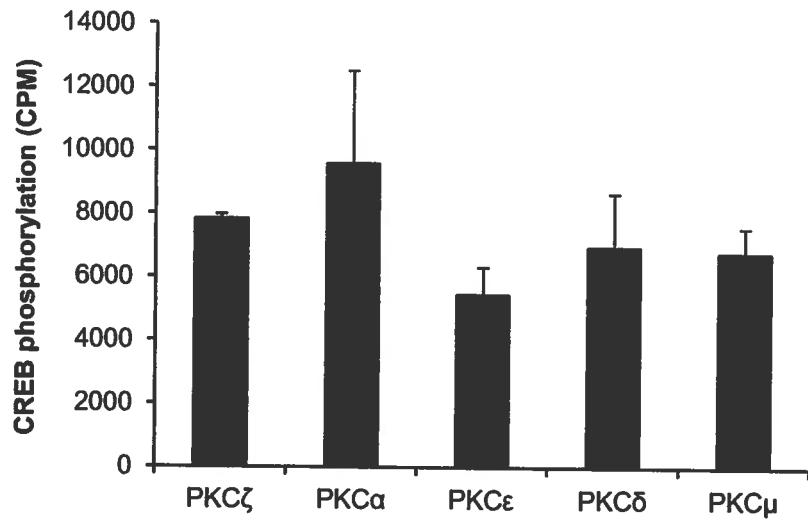
**Description:** This Excel file contains the results of the ChIP-on-chip analysis. The file contains the following three sheets: the *Interval* sheet, which lists genomic segments where signals or *P*-values are above the threshold, the active regions, which lists genomic regions containing one or more Intervals, and the gene sheet, which lists all genes that have Intervals within the chosen GeneMargin. Genes can have more than one Interval within the GeneMargin. The GeneMargin is the chosen distance upstream and downstream of a gene that determines whether an Interval is associated with that gene. GeneMargins are typically set to 10,000 bp, that is, any Interval within 10,000 bp upstream or downstream of a gene is counted as being associated with that gene.

# Figure 1

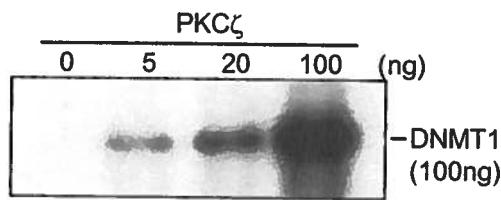
A



B



C

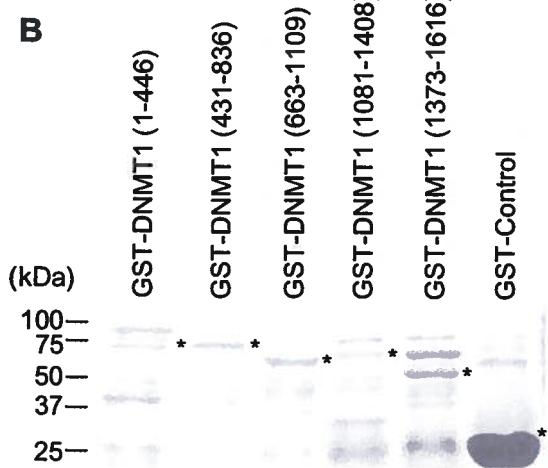


# Figure 2

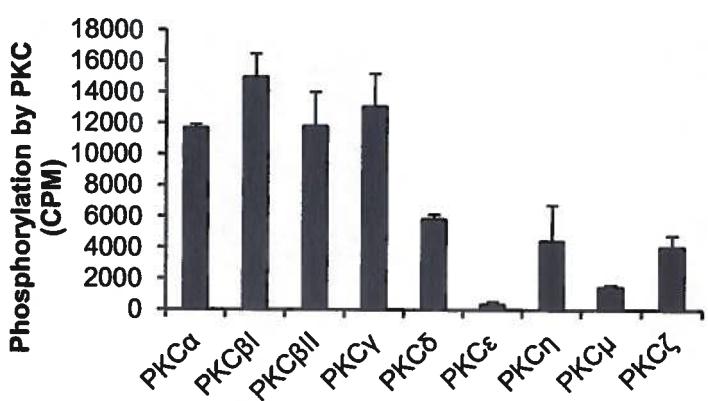
**A**



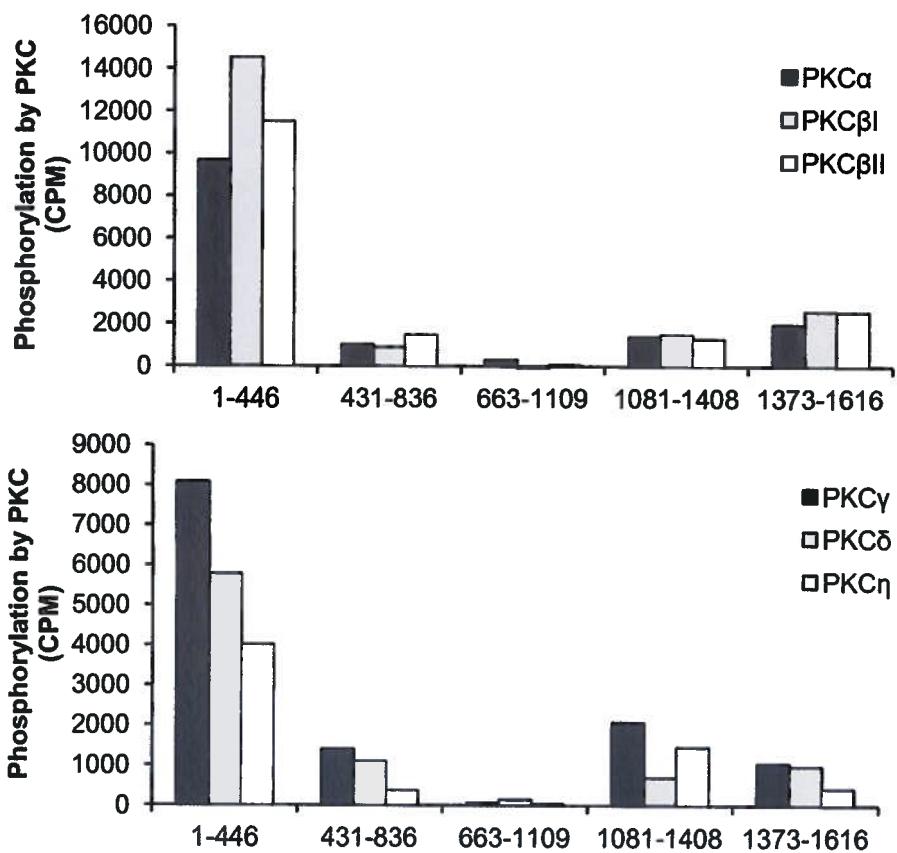
**B**



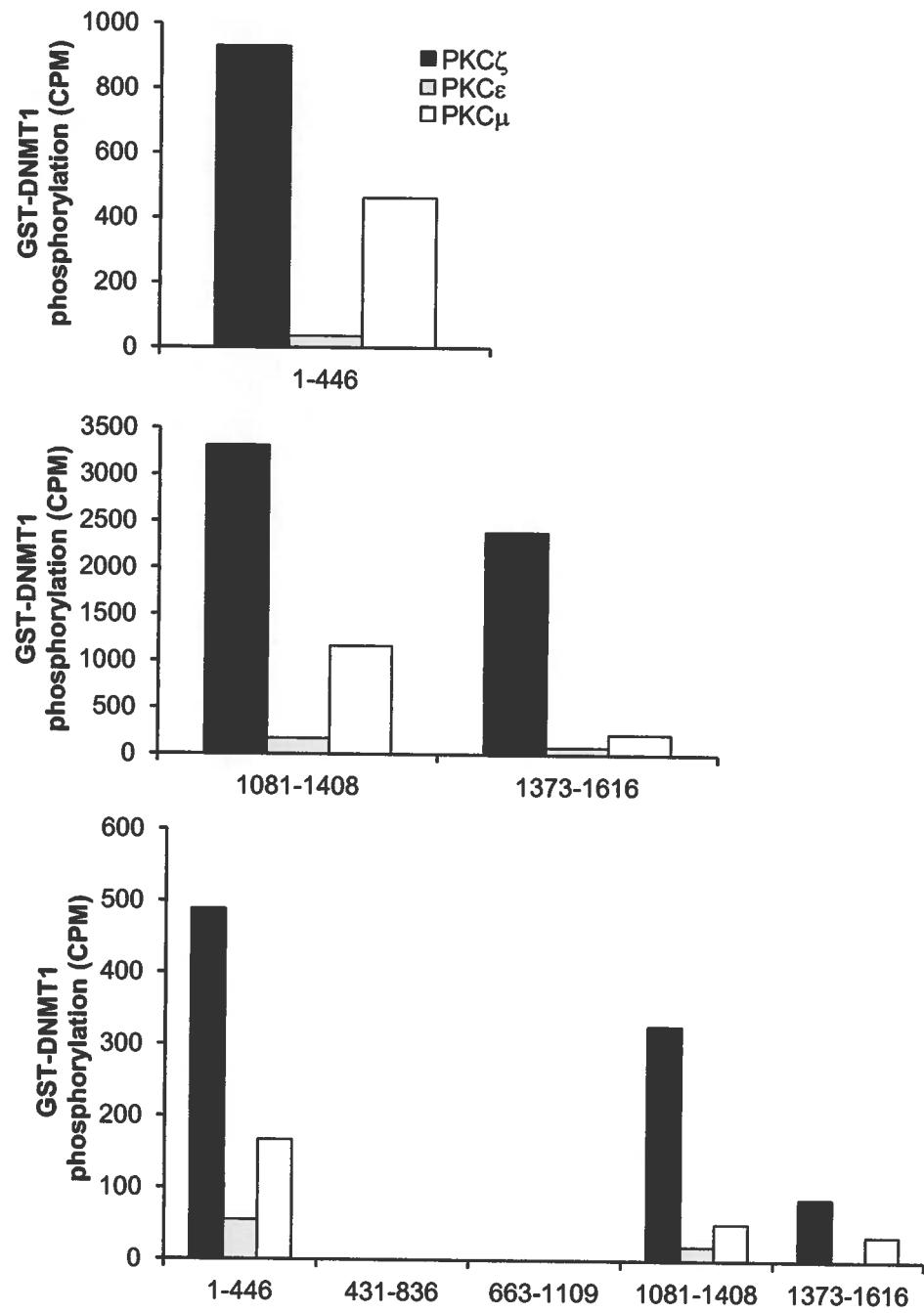
**D**



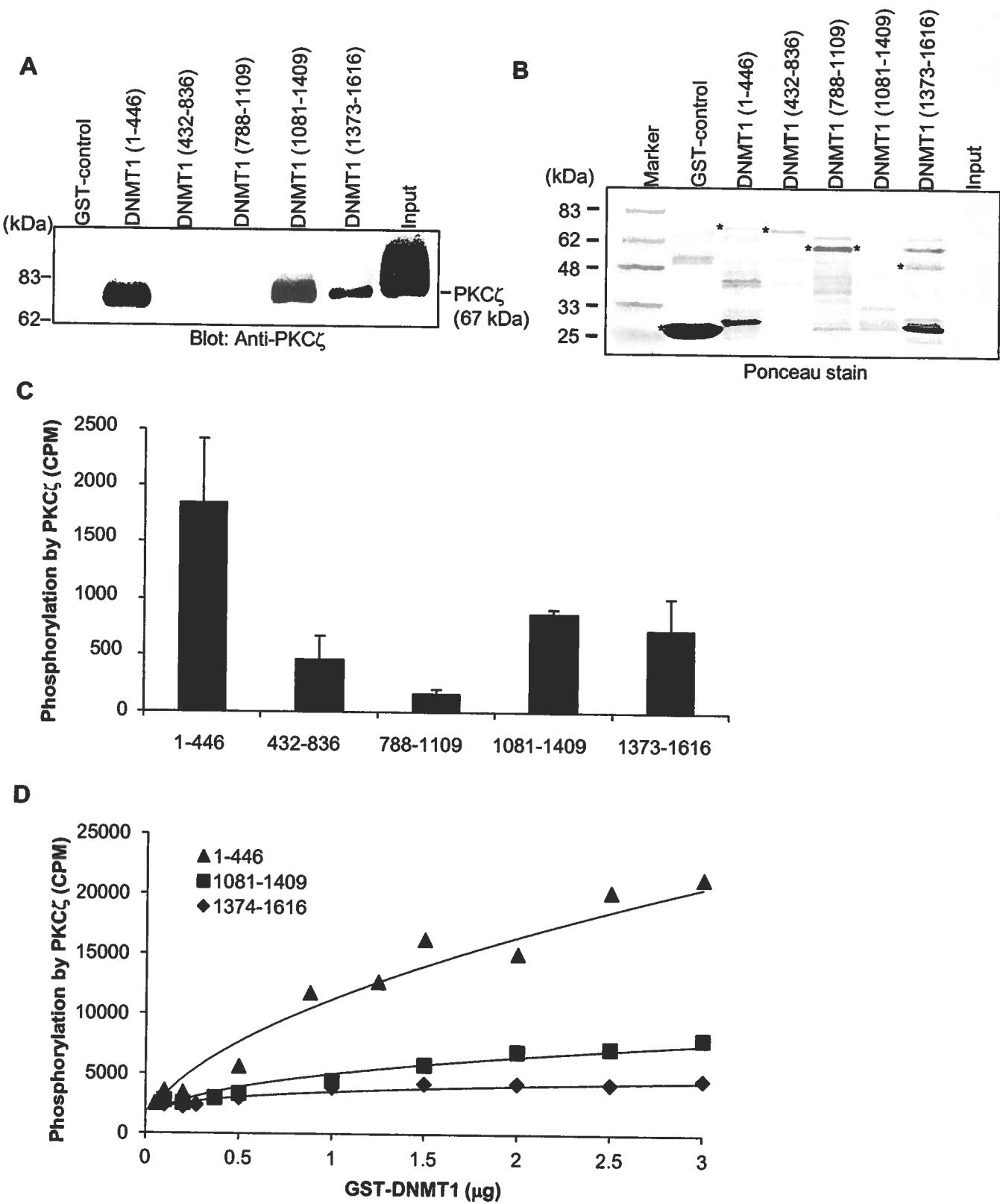
**C**



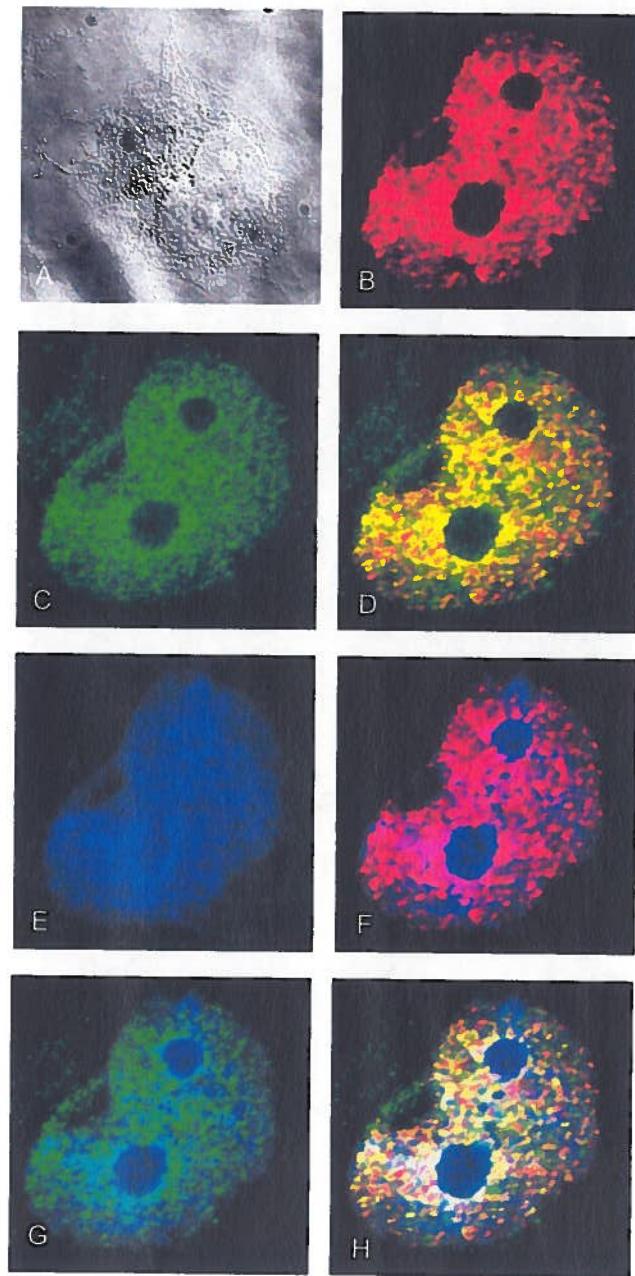
# Figure 3



# Figure 4

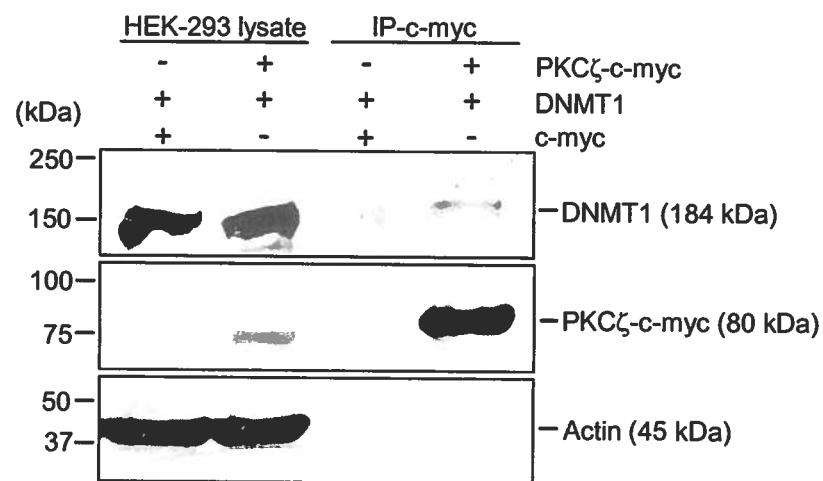


# Figure 5

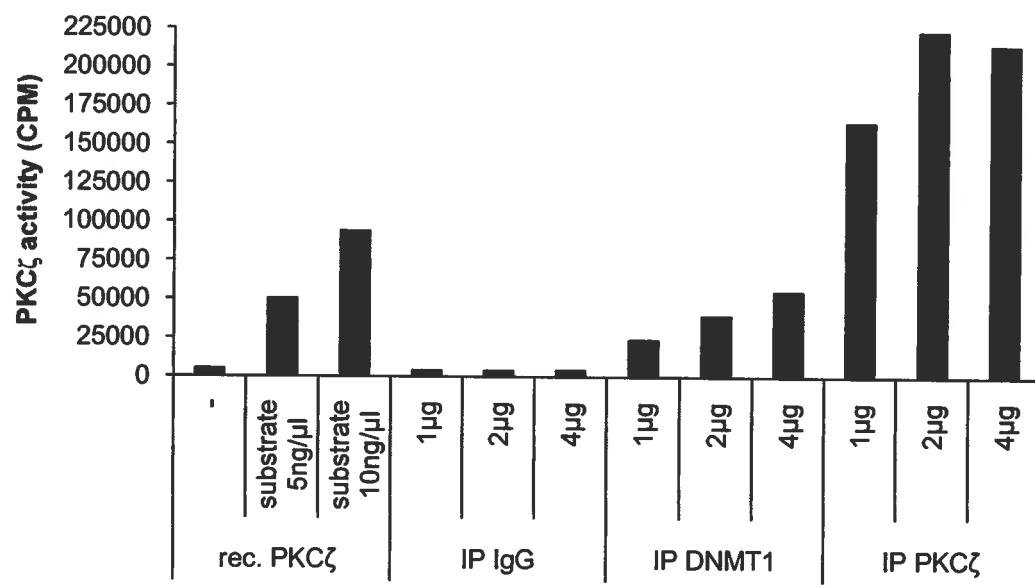


# Figure 6

A

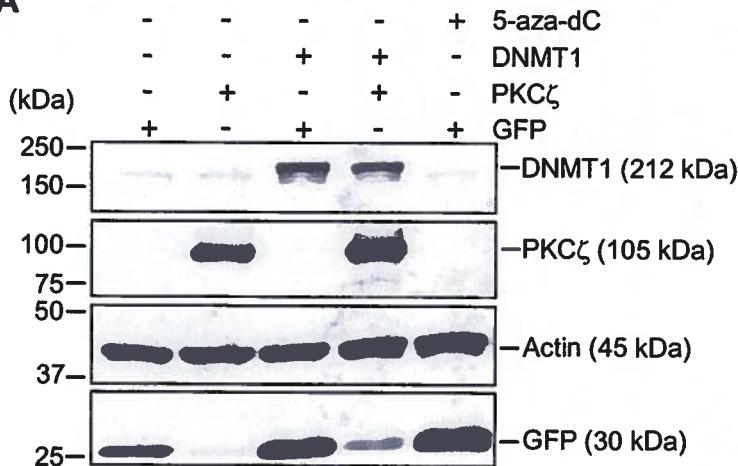


B

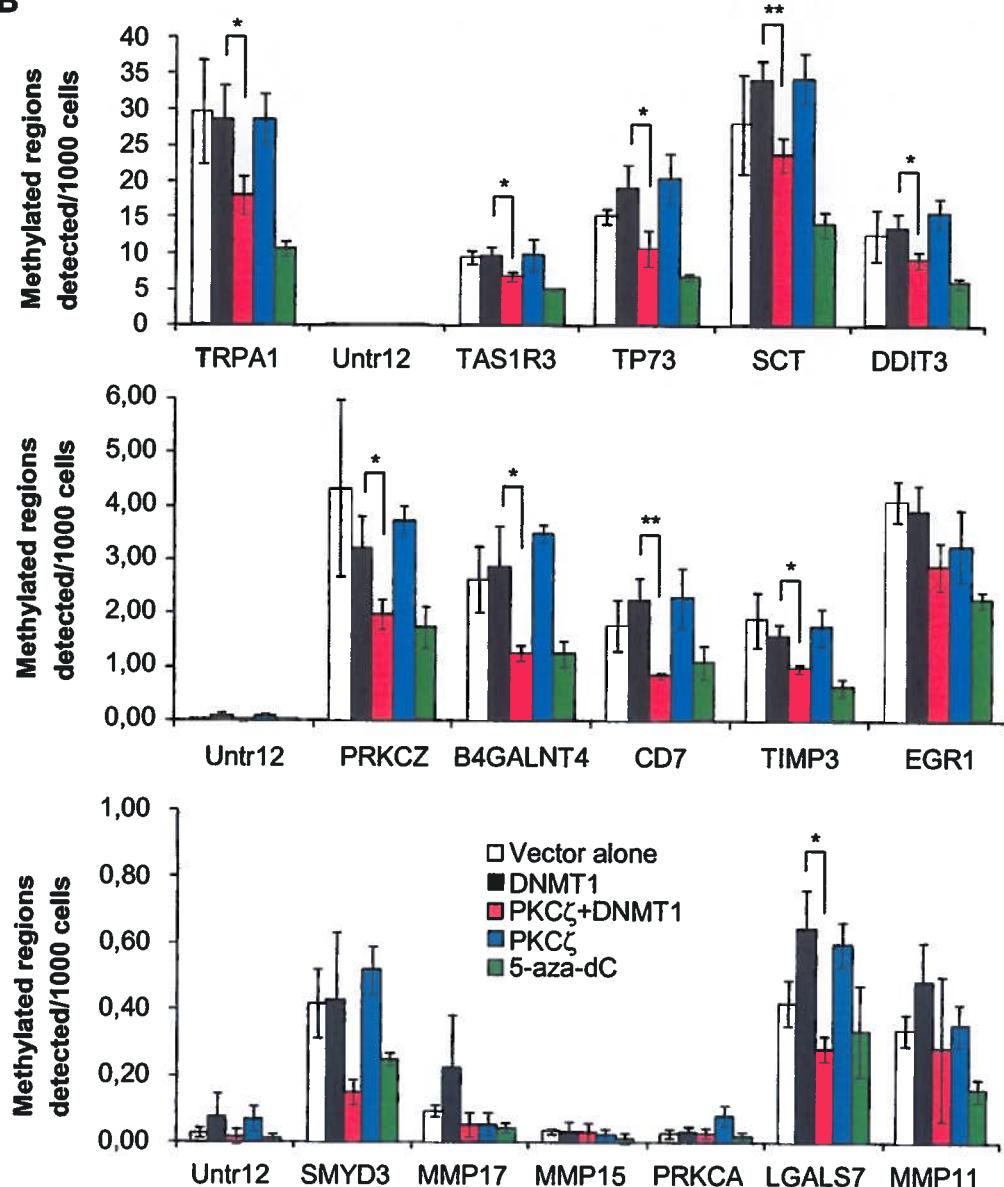


# Figure 7

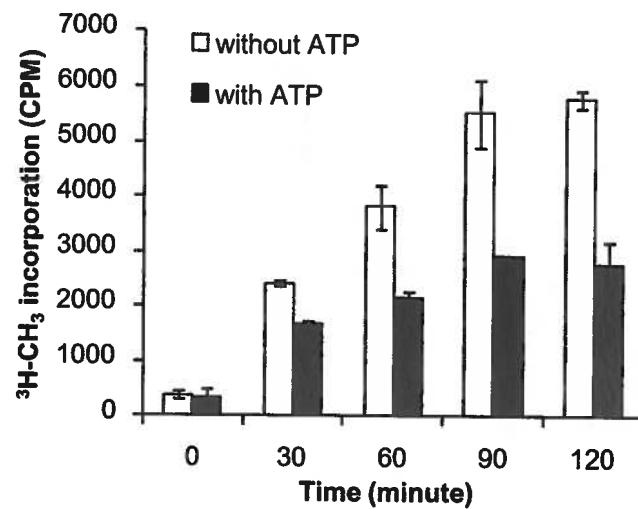
**A**



**B**



# Figure 8



## **CHAPITRE III**

**Phosphorylation of human DNMT1: Implication of cyclin-dependent kinases**

Lavoie, G. and St-Pierre, Y.

Manuscrit publié dans *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2011,  
409(2):187-92.

## **CONTRIBUTION DES AUTEURS**

J'ai réalisé toutes les expériences décrites dans cet article. J'ai de plus participé à l'élaboration des approches expérimentales, des protocoles et à la mise au point des expériences ainsi qu'à l'analyse et l'interprétation des résultats. J'ai aussi rédigé le manuscrit en collaboration avec le Pr. St-Pierre. Le tiré à part de l'article se trouve en annexe 2.

## RÉSUMÉ

La méthylation de l'ADN, qui joue un rôle central dans la régulation de l'expression des gènes et la stabilité de la chromatine, est catalysée principalement par la méthyltransférase de l'ADN de maintenance (DNMT1). Il a été démontré que la sérine 154, localisée dans le domaine N-terminal de cette enzyme, était phosphorylée dans les cellules HEK-293 et HeLa. Dans la présente étude, nous avons investigué les protéines kinases qui pourraient phosphoryler la Ser154 de la DNMT1 humaine et avons identifié les kinases dépendantes de cyclines (CDK) par des analyses de phosphorylation *in vitro*. La phosphorylation de la DNMT1 endogène au niveau de la Ser154 par les CDK1, 2 et 5 a aussi été démontrée dans les cellules HEK-293 traitées à la roscovitine. Afin de déterminer l'importance de la phosphorylation de la Ser154, nous avons généré un mutant de DNMT1 qui annule complètement le potentiel de phosphorylation de cette sérine (Sépine 154 vers Alanine; S154A). Ce mutant de DNMT1 a d'ailleurs une perte sévère de son activité enzymatique lorsque comparé au type sauvage. De plus, suite au traitement à la 5-aza-dC, nous avons observé une diminution plus rapide du niveau protéique de DNMT1 dans les cellules HEK-293 exprimant DNMT1(S154A) par rapport aux cellules exprimant DNMT1 de type sauvage. Nos résultats suggèrent que la phosphorylation de la DNMT1 humaine au niveau de la sérine 154 par les CDK est importante pour son activité enzymatique et sa stabilité. Considérant le fait que les tumeurs associées aux défauts du cycle cellulaire sont souvent causées par la mauvaise régulation de l'activité des CDK, nous proposons que la dérégulation des CDK pourrait induire une phosphorylation anormale de DNMT1 et ainsi mener à l'hyperméthylation de l'ADN, un phénomène souvent observé dans les cellules cancéreuses.

## INTRODUCTION

Mammalian DNA methylation is essential for embryonic development and mainly occurs at CG sequences at the level of cytosines [1,2]. There are two classes of enzymes responsible of DNA methylation at CpG dinucleotides in mammals; *de novo* type of DNA methyltransferases (DNMT) DNMT3a and DNMT3b, which are responsible for creating DNA methylation patterns during embryogenesis and germ cells, and maintenance type DNMT1, the most prevalent DNA methyltransferase found in cells and which is responsible for maintaining the DNA methylation patterns once formed. While the DNMT1 enzyme have a preference for hemimethylated DNA generated during DNA replication [3], DNMT3a and DNMT3b act on either hemimethylated or unmethylated DNA [2].

The 180-kDa DNMT1 harbors the DNMT catalytic domain in its C-terminus and several regulatory domains in its N-terminus. The N-terminal region interacts with several proteins such as DMAP1 (DNMT-associated protein), HDAC2 (histone deacetylase), PCNA (proliferating cell nuclear antigen) and Rb (retinoblastoma) [4-6]. While phosphorylation of human DNMT1 at multiple sites has been recently reported [7-10], to date, very few studies have focused on the identification of serine/threonine kinases involved. A recent report by Hervouet *et al.* (2010) [11] showed that Akt and PKC (protein kinase C) were capable of phosphorylating DNMT1 at the specific residues serine-127/143 and serine-127 respectively, possibly regulating its interaction with PCNA and UHRF1 (ubiquitin-like with PHD and ring-finger domains). Interestingly, phosphorylation of human DNMT1 on Ser143 by AKT1 may possibly involve an interplay between monomethylation of DNMT1 on Lys142 by SET7, thereby influencing the protein stability of DNMT1 [12]. In the present work, we report that members of the cyclin-dependent kinase (CDK) family, including CDK1, 2 and 5, can phosphorylate human DNMT1 at Ser154. We further provide evidence for a critical role of Ser154 in controlling DNMT1 enzymatic activity and protein stability. Taken together, our results suggest an important role for CDKs in controlling DNA methylation patterns in mammalian cells.

## MATERIALS AND METHODS

**Cell line and reagents.** The HEK-293 cell line was obtained from the American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA) and maintained in Dulbecco's modified Eagle complete

medium (DMEM) [supplemented with 10% (v/v) FCS, 2 mmol/L L-glutamine, 10 mmol/L Hepes buffer]. All cell culture products were from Life Technologies (Burlington, ON, Canada). All other reagents were purchased from Sigma-Aldrich (Oakville, ON, Canada), unless otherwise indicated.

**Treatment with roscovitine and Western blot analysis.** HEK-293 cells were treated with 5 to 20  $\mu$ M of roscovitine (EMD Chemicals, Mississauga, ON) for 16 h or 50  $\mu$ M for one hour. Nuclear extracts were then prepared using the CelLytic Nuclear Extraction kit. Equal amounts of cell nuclear lysates were separated onto a 6 % SDS-PAGE gel and transferred onto nitrocellulose membranes (Bio-Rad Laboratories, Mississauga, ON). The membranes were blocked with 5% BSA in TBS/0.05% Tween 20 or 5% milk in PBS/0.05% Tween 20 overnight at 4°C and probed for two hours at room temperature with the primary anti-histidine antibody (Amersham Biosciences, Baie d'Urfé, QC) or antibodies specific for DNMT1 (New England Biolabs, Ipswich, MA) or pDNMT1<sup>S154</sup> (Abgent, Brockville, ON). After several washes in PBS/0.05% Tween 20, membranes were probed with horseradish peroxidase conjugated anti-mouse or anti-rabbit secondary antibody (Amersham Biosciences) for one hour at room temperature, followed by several washes in PBS/0.05% Tween 20. Detection was performed using the enhanced chemiluminescence method (Amersham Biosciences).

**Site-directed mutagenesis.** Ser154 and Ser714 of human DNMT1 were mutated using the PfuTurbo DNA polymerase (Stratagene, Mississauga, ON) in the DNA plasmids pCDNA4.DNMT1 (his-tagged DNMT1) and pGEX-5X-1.DNMT1(1-446). The mutagenic primers were as follow: forward primer 5'-CCTAACCTTCACCTGCCCCA-GGATTACAAGG-3' and reverse primer 5'-CCTTGTAATCCTGGGGCAGGTGAAGG-TTCAGG-3', which converted Ser154 to alanine (S154A); forward primer 5'-CCAGAGATGCCGGCACCCAAAAAAATGCAC-3' and reverse primer 5'-GTGCATTTTTTGGGTGCCGGCATCTGG-3', which converted Ser714 to alanine (S714A). The presence of the specific mutations was validated by DNA sequencing.

**Protein expression, purification and phosphorylation.** GST (glutathione S-transferase) fusion proteins and GST control proteins were expressed in *Escherichia coli* BL21 cells. Briefly, following induction with 0.3 mM isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactoside (IPTG) overnight at 16°C, GST fusion proteins were purified from bacterial crude cell lysates using glutathione-Sepharose beads

(Pfizer-Pharmacia, New York, NY). GST proteins bound to beads were then incubated with 50  $\mu$ M ATP, 1  $\mu$ Ci [ $\gamma$ - $^{32}$ P]ATP (Perkin Elmer, Montreal, QC) in kinase buffer (Cell Signaling Technology, Beverly, MA) in presence of 20 nM of activated human recombinant CDK1/CycB, CDK2/CycA or CDK5/p25NCK (neuronal CDK activator) (Cell Signaling Technology) at 37°C for 30 min. Beads were washed three times and processed for measure of phosphate incorporation in scintillation liquid. In some experiments, the GST fusion proteins (DNMT1(1-446)) bound to beads were incubated with 200  $\mu$ M ATP in kinase buffer in presence of 20 nM of activated human recombinant PKC $\zeta$ , PKC $\alpha$ , CDK1/CycB, CDK2/CycA, CDK5/p25NCK or GSK3- $\beta$  (glycogen synthase kinase3- $\beta$ ) (Cell Signaling Technology) at 37°C for 30 min. The reactions were stopped by resuspending in Laemmli buffer and processed for Western blotting.

**Transfection.** HEK-293 cells were seeded in 100 mm Petri dishes the day before transfection at a density of 2 x 10<sup>6</sup> cells/Petri dish and transfected for 48 h with the following vectors: pCDN4.DNMT1, pCDNA4.DNMT1S154A, pCDNA4.DNMT1S714A or pCDNA4 (empty control vector) using DNAfectin (Applied Biological Materials Inc., Richmond, BC). Cells were then washed with PBS and nuclear proteins extracted. Equal amounts of cell lysates (5 $\mu$ g) were then separated in a 6% SDS-PAGE gel and transferred onto nitrocellulose membranes. Western blot was processed as described above.

**Co-immunoprecipitation.** HEK-293 cells were transfected with the pCDNA4.DNMT1 vector. After 48 hours, the cells were harvested and nuclear proteins extracted using the CelLytic NuCLEAR extraction kit. Equal amounts of nuclear lysates (500  $\mu$ g) were used for each immunoprecipitation. Antibodies specific for human CDK5 (Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA) or an isotypic IgG control antibody were incubated overnight with nuclear lysates in presence of protease inhibitors (at 4°C). Immunocomplexes were incubated with protein G beads (pre-bounded with 1% BSA) for two hours at 4°C. After several washes in phosphate buffer, the protein complexes were resuspended in Laemmli loading buffer. Precipitated proteins were analyzed by Western blotting using anti-CDK5 and anti-DNMT1 (New England Biolabs) antibodies.

**GST pull-down assays.** Binding assays were performed by pre-incubating the glutathione-Sepharose beads bound to GST alone (control) or GST-DNMT1(1-446) (phosphorylated or not with CDK2/CycA or CDK5/p25NCK) with 100  $\mu$ g/ml BSA in a binding buffer (50 mM Tris pH

7.5, 28 µM ZnCl<sub>2</sub>, 1% Triton X-100, 220 mM NaCl, 10% glycerol) at 4°C for one hour. The beads were then centrifuged, resuspended in the binding buffer and incubated with 100 µg (for CDK5) or five µg (for PCNA) of HEK-293 nuclear proteins for one hour at 4°C. Beads were then washed three times with binding buffer containing 500 mM NaCl. The beads were mixed with Laemmli buffer and incubated at 98°C for five min before loading on a 12% polyacrylamide gel. Gels were blotted onto a nitrocellulose membrane and probed using CDK5- or PCNA-specific (Abcam, Cambridge, MA) antibody.

**DNA methyltransferase assays.** DNA methyltransferase assays were carried out at 37°C for two hours in a total volume of 25 µL of reaction mix containing nuclear proteins collected from HEK-293-transfected cells, 2 µCi of *S*-adenosyl-1-[methyl-<sup>3</sup>H]methionine (AdoMet) (Perkin Elmer) and 250 ng of poly(dI-dC)·poly(dI-dC) in DNA methyltransferase buffer (50 mM Tris-HCL, pH 7.8, 1 mM Na<sub>2</sub>EDTA, pH 8.0, 1 mM DTT, 7 µg/ml phenylmethylsulfonyl fluoride, 5% glycerol). Reactions were stopped by transfer on dry ice/ethanol and filtered using DE81 membranes (Millipore, Billerica, MA). Filters were washed sequentially four times with one ml of ice-cold 0.2 M ammonium bicarbonate, four times with one ml of Milli Q water and four times with one ml of ethanol. Incorporation of radioactive AdoMet was measured using standard methods.

**Protein stability analysis.** HEK-293 cells were seeded in 100 mm Petri dish the day before transfection at a density of 2 x 10<sup>6</sup> cells/Petri dish. 24 h after transfection with pCDNA4, pCDNA4.DNMT1 or pCDNA4.DNMT1S154A, cells were seeded in six well plates at a density of 2 x 10<sup>5</sup> cells/well and treated the following day with 5-Aza-2'-Deoxycytidine (5-aza-dC) (10µM) for the indicated time. Alternatively, 72 h after transfection, the cells were seeded in six well plates at a density of 2 x 10<sup>5</sup> cells/well. At different times post culture (24-96 h) protein extracts were prepared and equal amounts of cell lysates (125 µg) processed for Western blot analysis using anti-histidine or anti-actin antibody.

## RESULTS AND DISCUSSION

### *CDK1, 2 and 5 phosphorylate DNMT1 at Ser154 in vitro*

To search for novel candidate kinases that are capable of phosphorylating human DNMT1 protein, we used a computer-based scan approach (UniProt ID: P26358; <http://scansite.mit.edu>)

(Table I). The search produced several hits for members of the CDK family, including CDK1/CycB, CDK2/CycA and CDK5/p25NCK. CDKs are critical regulators of chromosome replication, segregation and cell division and act in complex with activatory subunits (called cyclins; Cyc) to phosphorylate their target proteins on specific amino acids residues [13]. CDK1, 2 and 5 are proline-directed kinases that phosphorylate serine and threonine immediately upstream of a proline residue [14]. A general consensus site for these CDKs was identified as (S/T)PX(K/R), where S or T are the phosphorylatable serine or threonine, X is any amino acid, and P is the obligatory proline residue in the +1 position [15]. Even if CDKs show a preference for a basic residue in the +3 position, phosphorylation at this site is not excluded for other amino acids in that position [16]. Interestingly, amino acids surrounding Ser154 of DNMT1 (SPSPRIT) are close to this consensus site, raising the possibility that CDKs could be implicated in the control of DNA methylation by phosphorylation of DNMT1 Ser154 during the cell cycle. This serine was previously identified as a major phosphorylated site in several cell lines, including HEK-293 [8] and HeLa cells [9,10]. Using an *in vitro* phosphorylation assays with GST fusion DNMT1 fragments, we confirmed that activated CDK1/CycB, CDK2/CycA and CDK5/p25NCK could phosphorylate human DNMT1, with a predilection for amino acids 1-446 within the N-terminal domain (Figure 1A). Using a specific antibody against the phosphorylated form of Ser154 of DNMT1 (pDNMT1<sup>S154</sup>), we have further found that activated CDK1/CycB, CDK2/CycA and CDK5/p25NCK specifically phosphorylate the Ser154 residue of DNMT1(1-446) (Figure 1B and C). No such phosphorylation was observed with PKC $\alpha$ , PKC $\zeta$ , and GSK-3 $\beta$ . The phosphorylation of DNMT1 at Ser154 by CDK1, 2 and 5 was specific since a Ser-Ala mutation at position 154 (S154A) completely abolished the ability of CDKs to phosphorylate DNMT1 (Figure 1C).

#### *CDK 1, 2 and 5 phosphorylate DNMT1 at Ser154 in vivo*

To determine whether CDK1, 2 and 5 could phosphorylate DNMT1 at Ser154 *in vivo*, HEK-293 cells were transfected with expression vectors encoding wild type DNMT1, DNMT1(S154A), DNMT1(S714A), or a control (empty) vector and analyzed by Western blots using the pDNMT<sup>S154</sup>-specific Ab. As previously reported by mass spectroscopy [8], we found that wild type DNMT1 was phosphorylated at Ser154 in HEK-293 cells (Figure 2A). This phosphorylation was specific since no such phosphorylation was detected in cells transfected

with DNMT1 harboring a S→A substitution at position 154. In contrast, a S→A substitution at position 714 did not affect the ability of the Ab to detect the pDNMT1<sup>S154</sup> form. Endogenous DNMT1 was also found to be phosphorylated at Ser154 in HEK-293 cells nuclear lysates (**Figure 2B**).

To determine whether members of the CDK family were involved in phosphorylation of DNMT1 at Ser154, HEK-293 cells were treated with roscovitine, a specific inhibitor of CDK1, 2 and 5 [17]. We found that treatment with roscovitine markedly reduced Ser154 phosphorylation on endogenous DNMT1 (**Figure 2C, upper panel**). This inhibition was dose-dependent (**Figure 2D, upper panel**). This decrease of Ser154 phosphorylation was not attributed to a decrease in DNMT1 protein level (**Figure 2C and D, lower panel**). Taken together, these results suggest that members of the CDK family, which play a central role in cell division, control DNA methylation during the cell cycle by means of post-translational modification of DNMT1. Such hypothesis is consistent with previous results obtained by Goyal *et al.* (2007) [18] for murine DNMT1, which is activated upon phosphorylation at Ser515 residue. It is also consistent with a recent study showing that dynamic changes in the phosphorylation status of DNMTs occurs during differentiation of hESC (human embryonic stem cells) [19].

#### *CDK5 interacts with DNMT1*

Using nuclear extracts from HEK-293 cells, the ability of CDKs to physically interact with the N-terminal domain of DNMT1 was further assessed by detecting the ability of endogenous CDK5 to bind to the GST-DNMT1(1-446) fragment (**Figure 3A**). No such binding of CDK5 was detected using a control GST construct, indicating that binding of CDK5 to the N-terminal domain of DNMT1 was specific. Such physical interaction between CDK5 with DNMT1 was also detected in immunoprecipitates of CDK5 obtained from HEK-293 cells transfected with wild type DNMT1 (**Figure 3B**).

#### *Phosphorylation of DNMT1 by CDKs has no effect on its interaction with PCNA*

The N-terminal domain of DNMT1 is involved in the binding of several modulator proteins, including PCNA. In addition to DNMT1, CDK1, 2 and 5 have been found to interact with PCNA during the cell cycle [20,21]. Since Ser154 residue is located near the PCNA-binding motif (located at position 162-171) [4], we next investigated whether phosphorylation of DNMT1 by

CDK2 and 5 affected PCNA binding to DNMT1. For this purpose, GST-DNMT1(1-446) (or control GST) bound to glutathione Sepharose was phosphorylated by CDK2/CycA or CDK5/p25NCK before incubation with nuclear lysates from HEK-293 cells. The mixture was then pulled down by centrifugation and analyzed for binding of PCNA. Our results showed that PCNA bound equally well to both phosphorylated and non-phosphorylated state of DNMT1(1-446) (**Figure 3C**), indicating that association of PCNA with DNMT1 is not regulated by phosphorylation of Ser154.

*Ser154 residue of DNMT1 is important for its activity and its stability*

Post-translational modifications by phosphorylation play a crucial role in many molecular processes, including enzymatic activity. We have thus examined whether Ser154 is important for DNMT1 enzymatic activity. For this purpose, expression vectors encoding wild type DNMT1 and DNMT1(S154A) were transfected in HEK-293 cells. Analysis of nuclear extracts showed that cells transfected with the DNMT1(S154A) mutant had significantly lower DNA methyltransferase activity as compared to cells transfected with wild type DNMT1 (**Figure 4A**). Nuclear extracts from cells transfected with DNMT1(S154A) had a comparable level of DNA methyltransferase activity to nuclear extracts from cells transfected with a control (empty) vector. These results suggest that Ser154 is important for the methyltransferase activity of DNMT1. Interestingly, the mouse orthologous Ser152 of DNMT1 is constitutively phosphorylated in mouse tissues [22]. Moreover, a recent study by D'Aiuto *et al.* [23] showed that amino acids 124-160 is an essential region for murine DNMT1 activity. Our results are consistent with these observations and further support findings showing that isolated catalytic domain of DNMT1 enzyme is insufficient for the enzymatic activity [24-26]. Since Ser154 is separated by 985 amino acids from the catalytic domain, these results suggest that phosphorylation of Ser154 may influence domain-domain interactions. Such interaction between the N- and C-terminal domains of DNMT1 has been reported previously [24,27]. Alternatively, Ser154 may be important for the stability of DNMT1. D'Aiuto *et al.* [23] have indeed found that mutations at amino acids 124-160 resulted in a greater degradation rate of DNMT1. We thus investigated whether Ser154 alone is important for DNMT1 stability. To test this possibility, HEK-293 cells were transfected with an expression vector encoding wild type or mutant DNMT1(S154A) and protein expression levels were measured at different times post-transfection. No differences were observed, however, in

protein levels of wild type DNMT1 and DNMT1(S154A) (**Figure 4B**), suggesting that mutation at Ser154 alone is not sufficient to alter constitutive DNMT1 stability. Since DNMT1 protein level decreases in a time-dependant manner following treatment with 5-aza-dC [28], we next assessed the role of S154A following treatment with 5-aza-dC. As expected, we found a time-dependant decrease in DNMT1 level following treatment with 5-aza-dC. This decrease, however, was more severe, in the case of DNMT1(S154A), most notably at six hour post-treatment, as compared to wild type DNMT1 (**Figure 4C**).

In conclusion, the current study demonstrated for the first time that members of the CDK family are involved in the phosphorylation of DNMT. More specifically, we found that CDK1, 2 and 5 phosphorylated human DNMT1 at Ser154 *in vitro* and in HEK-293 cells. Our results further suggest that phosphorylation on Ser154 by CDKs may play a role in controlling DNMT1 activity and protein stability. Whether aberrant phosphorylation of DNMT1 leads to increased DNMT1 activity, thereby contributing to DNA hypermethylation in cancer cells is an interesting possibility. Further experiments will be needed to address this hypothesis.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

The authors wish to thank Dr. Sriharsa Pradhan and Dr. Pierre-Olivier Estève from New England Biolabs for providing vectors and helpful discussions, and Diane Tremblay and Nathalie Bibens Laulan for their technical support. This research was supported by a grant from the National Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC). G.L. is supported by a studentship from the Canadian Institute for Health Research of Canada (CIHR).

## REFERENCES

- [1] E. Li, T.H. Bestor, and R. Jaenisch, Targeted mutation of the DNA methyltransferase gene results in embryonic lethality. *Cell* 69 (1992) 915-26.
- [2] M. Okano, D.W. Bell, D.A. Haber, and E. Li, DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. *Cell* 99 (1999) 247-57.
- [3] S. Pradhan, A. Bacolla, R.D. Wells, and R.J. Roberts, Recombinant human DNA (cytosine-5) methyltransferase. I. Expression, purification, and comparison of de novo and maintenance methylation. *J Biol Chem* 274 (1999) 33002-10.
- [4] L.S. Chuang, H.I. Ian, T.W. Koh, H.H. Ng, G. Xu, and B.F. Li, Human DNA-(cytosine-5) methyltransferase-PCNA complex as a target for p21WAF1. *Science* 277 (1997) 1996-2000.
- [5] M.R. Rountree, K.E. Bachman, and S.B. Baylin, DNMT1 binds HDAC2 and a new co-repressor, DMAP1, to form a complex at replication foci. *Nat Genet* 25 (2000) 269-77.
- [6] K.D. Robertson, S. Ait-Si-Ali, T. Yokochi, P.A. Wade, P.L. Jones, and A.P. Wolffe, DNMT1 forms a complex with Rb, E2F1 and HDAC1 and represses transcription from E2F-responsive promoters. *Nat Genet* 25 (2000) 338-42.
- [7] S.A. Beausoleil, M. Jedrychowski, D. Schwartz, J.E. Elias, J. Villen, J. Li, M.A. Cohn, L.C. Cantley, and S.P. Gygi, Large-scale characterization of HeLa cell nuclear phosphoproteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101 (2004) 12130-5.
- [8] H. Molina, D.M. Horn, N. Tang, S. Mathivanan, and A. Pandey, Global proteomic profiling of phosphopeptides using electron transfer dissociation tandem mass spectrometry. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104 (2007) 2199-204.
- [9] N. Dephoure, C. Zhou, J. Villen, S.A. Beausoleil, C.E. Bakalarski, S.J. Elledge, and S.P. Gygi, A quantitative atlas of mitotic phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105 (2008) 10762-7.
- [10] J.V. Olsen, M. Vermeulen, A. Santamaria, C. Kumar, M.L. Miller, L.J. Jensen, F. Gnad, J. Cox, T.S. Jensen, E.A. Nigg, S. Brunak, and M. Mann, Quantitative phosphoproteomics reveals widespread full phosphorylation site occupancy during mitosis. *Sci Signal* 3 (2010) ra3.

- [11] E. Hervouet, L. Lalier, E. Debien, M. Cheray, A. Geairon, H. Rogniaux, D. Loussouarn, S.A. Martin, F.M. Vallette, and P.F. Cartron, Disruption of Dnmt1/PCNA/UHRF1 interactions promotes tumorigenesis from human and mice glial cells. *PLoS ONE* 5 (2010) e11333.
- [12] P.O. Esteve, Y. Chang, M. Samaranayake, A.K. Upadhyay, J.R. Horton, G.R. Feehery, X. Cheng, and S. Pradhan, A methylation and phosphorylation switch between an adjacent lysine and serine determines human DNMT1 stability. *Nat Struct Mol Biol* 18 (2011) 42-8.
- [13] D.O. Morgan, *The Cell Cycle - Principles of Control*, New Science Press, London, 2007.
- [14] R. Dhavan, and L.H. Tsai, A decade of CDK5. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2 (2001) 749-59.
- [15] N.R. Brown, M.E. Noble, J.A. Endicott, and L.N. Johnson, The structural basis for specificity of substrate and recruitment peptides for cyclin-dependent kinases. *Nat Cell Biol* 1 (1999) 438-43.
- [16] J.K. Holmes, and M.J. Solomon, A predictive scale for evaluating cyclin-dependent kinase substrates. A comparison of p34cdc2 and p33cdk2. *J Biol Chem* 271 (1996) 25240-6.
- [17] L. Meijer, A. Borgne, O. Mulner, J.P. Chong, J.J. Blow, N. Inagaki, M. Inagaki, J.G. Delcros, and J.P. Moulinoux, Biochemical and cellular effects of roscovitine, a potent and selective inhibitor of the cyclin-dependent kinases cdc2, cdk2 and cdk5. *Eur J Biochem* 243 (1997) 527-36.
- [18] R. Goyal, P. Rathert, H. Laser, H. Gowher, and A. Jeltsch, Phosphorylation of serine-515 activates the Mammalian maintenance methyltransferase Dnmt1. *Epigenetics* 2 (2007) 155-60.
- [19] K.T. Rigbolt, T.A. Prokhorova, V. Akimov, J. Henningsen, P.T. Johansen, I. Kratchmarova, M. Kassem, M. Mann, J.V. Olsen, and B. Blagoev, System-wide temporal characterization of the proteome and phosphoproteome of human embryonic stem cell differentiation. *Sci Signal* 4 (2011) rs3.
- [20] S. Koundrioukoff, Z.O. Jonsson, S. Hasan, R.N. de Jong, P.C. van der Vliet, M.O. Hottiger, and U. Hubscher, A direct interaction between proliferating cell nuclear antigen (PCNA) and Cdk2 targets PCNA-interacting proteins for phosphorylation. *J Biol Chem* 275 (2000) 22882-7.

- [21] E. Prosperi, The fellowship of the rings: distinct pools of proliferating cell nuclear antigen trimer at work. *FASEB J* 20 (2006) 833-7.
- [22] E.L. Huttlin, M.P. Jedrychowski, J.E. Elias, T. Goswami, R. Rad, S.A. Beausoleil, J. Villen, W. Haas, M.E. Sowa, and S.P. Gygi, A tissue-specific atlas of mouse protein phosphorylation and expression. *Cell* 143 (2010) 1174-89.
- [23] L. D'Aiuto, M. Marzulli, K.N. Mohan, E. Borowczyk, F. Saporiti, A. Vandemark, and J.R. Chaillet, Dissection of structure and function of the N-terminal domain of mouse DNMT1 using regional frame-shift mutagenesis. *PLoS ONE* 5 (2010) e9831.
- [24] M. Fatemi, A. Hermann, S. Pradhan, and A. Jeltsch, The activity of the murine DNA methyltransferase Dnmt1 is controlled by interaction of the catalytic domain with the N-terminal part of the enzyme leading to an allosteric activation of the enzyme after binding to methylated DNA. *J Mol Biol* 309 (2001) 1189-99.
- [25] C. Zimmermann, E. Guhl, and A. Graessmann, Mouse DNA methyltransferase (MTase) deletion mutants that retain the catalytic domain display neither de novo nor maintenance methylation activity in vivo. *Biol Chem* 378 (1997) 393-405.
- [26] A. Bacolla, S. Pradhan, J.E. Larson, R.J. Roberts, and R.D. Wells, Recombinant human DNA (cytosine-5) methyltransferase. III. Allosteric control, reaction order, and influence of plasmid topology and triplet repeat length on methylation of the fragile X CGG.CCG sequence. *J Biol Chem* 276 (2001) 18605-13.
- [27] J.B. Margot, A.E. Ehrenhofer-Murray, and H. Leonhardt, Interactions within the mammalian DNA methyltransferase family. *BMC Mol Biol* 4 (2003) 7.
- [28] K. Ghoshal, J. Datta, S. Majumder, S. Bai, H. Kutay, T. Motiwala, and S.T. Jacob, 5-Aza-deoxycytidine induces selective degradation of DNA methyltransferase 1 by a proteasomal pathway that requires the KEN box, bromo-adjacent homology domain, and nuclear localization signal. *Mol Cell Biol* 25 (2005) 4727-41.

## FIGURE LEGENDS

**Figure 1. DNMT1 Ser154 is phosphorylated by CDKs *in vitro*.** (A) Phosphorylation of GST fusion fragments of DNMT1(1-446, 431-836, 663-1109, 1081-1408 and 1373-1616 amino acids) following incubation with activated CDK1/CycB, CDK2/CycA or CDK5/p25NCK. DNMT1 phosphorylation was quantified as the ratio of CDK activity relative to negative control. Data are representative of three independent experiments. (B) Comparative analysis of phosphorylation of Ser154 on GST-DNMT1(1-446) by various serine/threonine kinases, including activated PKC $\alpha$ , PKC $\zeta$ , CDK5/p25CNK and GSK-3 $\beta$ . Proteins were processed by SDS/PAGE followed by detection of pDNMT1<sup>S154</sup> with a specific antibody. (C) Western blot analysis showing that substitution of Ser154 by an alanine abolishes the ability of CDKs to phosphorylate GST-DNMT1(1-446). Equal loading is indicated by Ponceau stain.

**Figure 2. Phosphorylation of Ser154 in HEK-293.** (A) Ser154 is specifically phosphorylated in HEK-293 cells. Vectors encoding wild type DNMT1, DNMT1(S154A), DNMT1(S714A) were transfected in HEK-293 cells. After 48 hours pDNMT1<sup>S154</sup> was detected in nuclear cell lysates by Western blotting. An anti-histidine antibody was used to detect transfected DNMT1. (B) Phosphorylation of endogenous DNMT1 at Ser154 in nuclear lysates of HEK-293 cells. pDNMT1<sup>S154</sup> and total DNMT1 were detected by Western blotting with antibodies specific for pDNMT1<sup>S154</sup> and DNMT1 respectively. (C) Effect of roscovitine on phosphorylation of pDNMT1<sup>S154</sup>. HEK-293 cells were treated overnight with indicated doses of roscovitine, a specific inhibitor of CDK1, 2 and 5. pDNMT1<sup>S154</sup> was detected by Western blotting as described above. (D) Dose-dependent effect of roscovitine on phosphorylation of pDNMT1<sup>S154</sup>. Total DNMT1 was used as loading control and visualized with an anti-DNMT1 antibody.

**Figure 3. Functional interaction between DNMT1 and CDK5 in HEK-293 cells.** (A) Binding of endogenous CDK5 to the N-terminal domain of DNMT1. HEK-293 cell nuclear extracts were mixed with GST-DNMT1(1-446) bound to Sepharose beads and pulled down by centrifugation. Input, 100  $\mu$ g. (B) Interaction between DNMT1 and endogenous CDK5 in HEK-293 cell nuclear extracts. Cells were transfected with vectors encoding wild type DNMT1. After 48 hours, CDK5 was immunoprecipitated. Pulled down DNMT1 and CDK5 were detected by Western blot analysis. (C) DNMT1/PCNA interaction is not disrupted by phosphorylation of DNMT1 at Ser154 by CDK2 and 5. HEK-293 cell nuclear extracts were mixed with GST-DNMT1(1-446)

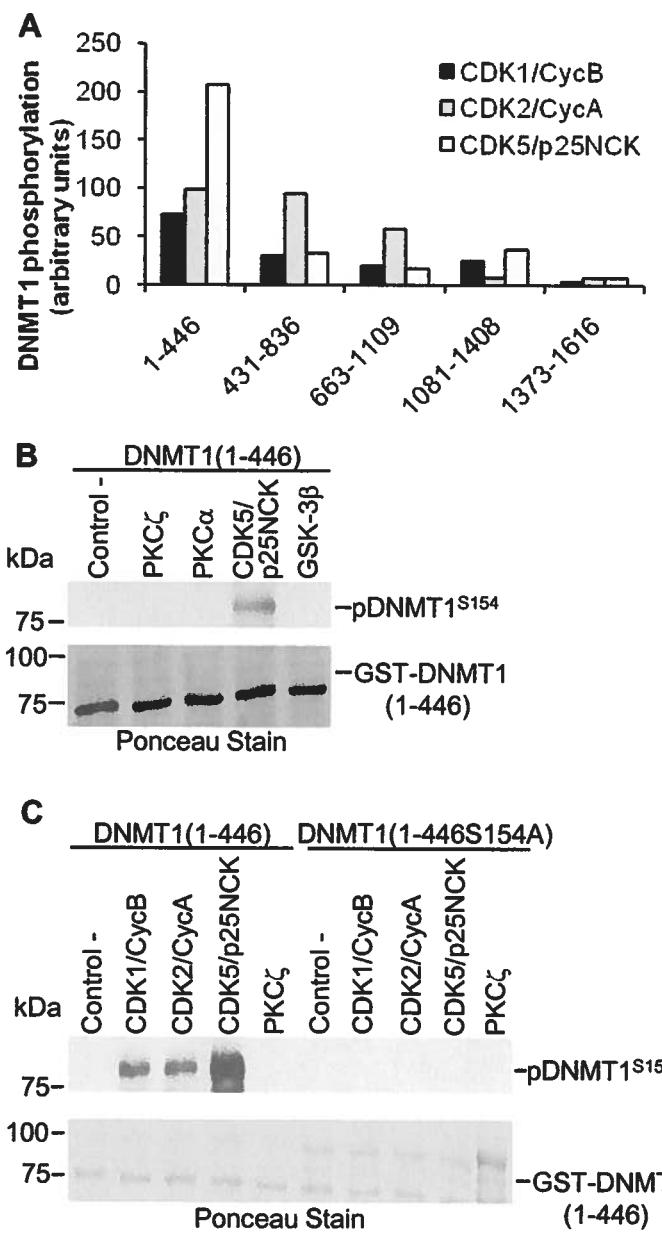
(phosphorylated or not by CDK2 or 5) bound to Sepharose beads and pulled down by centrifugation. The pulled down PCNA was then detected by Western blotting.

**Figure 4. Role of Ser154 on DNA methyltransferase activity and protein stability** (A) Comparison of DNA methyltransferase activity in nuclear extracts of HEK-293 cells transfected with vectors encoding wild type and mutant (S154A) DNMT1. DNA methyltransferase activity was measured by the incorporation of *S*-adenosyl-1-[*methyl*-<sup>3</sup>H]methionine in a DNA matrix poly(dl-dC).poly(dl-dC). Data are representative of three independent experiments. Bars, S.D. (B) Constitutive levels of wild type and mutant (S154A) DNMT1 at different times post-transfection. (C) Decreased protein levels of wild type and mutant (S154A) DNMT1 following treatment with 5-aza-dC (10 µM). DNMT1 was visualized by Western blotting using anti-histidine antibody. Actin was used as a loading control.

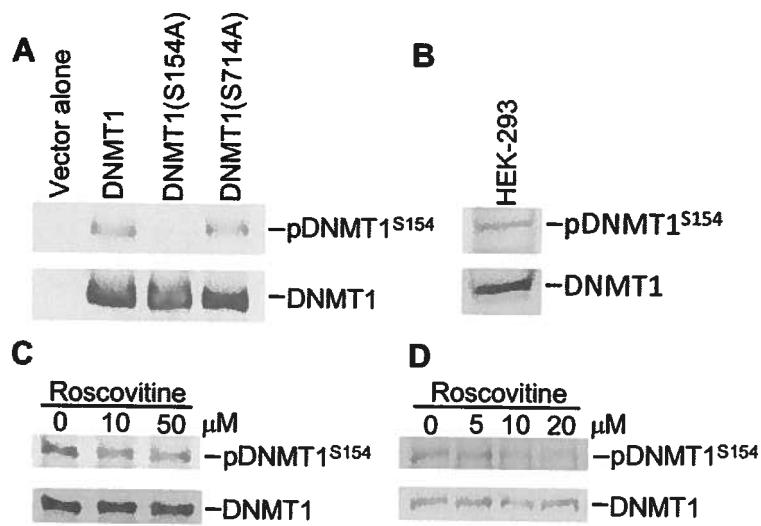
**Table I.** List of predicted phosphorylation sites and kinase candidates.

Predicted phosphorylation sites	Kinase candidates
Serine 137	CDK1, CDK5, GSK-3, PKC $\alpha/\beta/\gamma$
Serine 143	Clk2, 14-3-3
Serine 152	CDK1, CDK5, Erk1
Serine 154	CDK1, CDK5, GSK-3
Serine 209	Akt, AMP-kinase, Clk2
Serine 714	CDK1, CDK5
Serine 954	CDK1, CDK5
Serine 1105	CDK1, CDK5

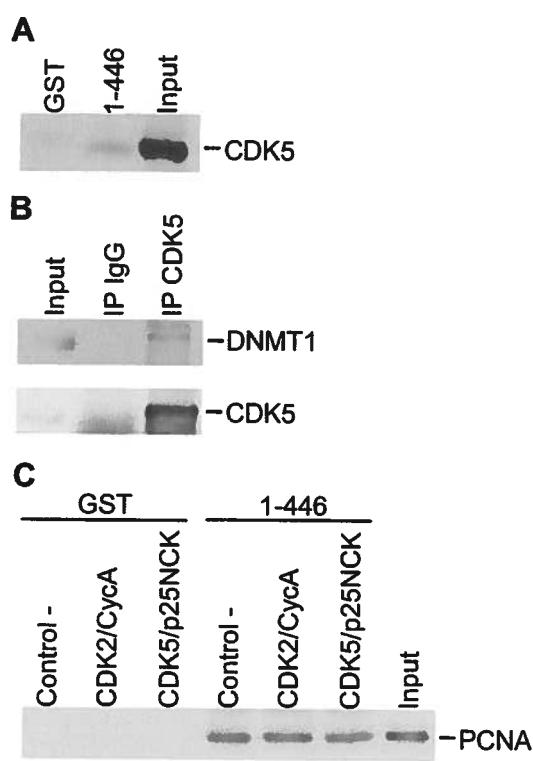
# Figure 1



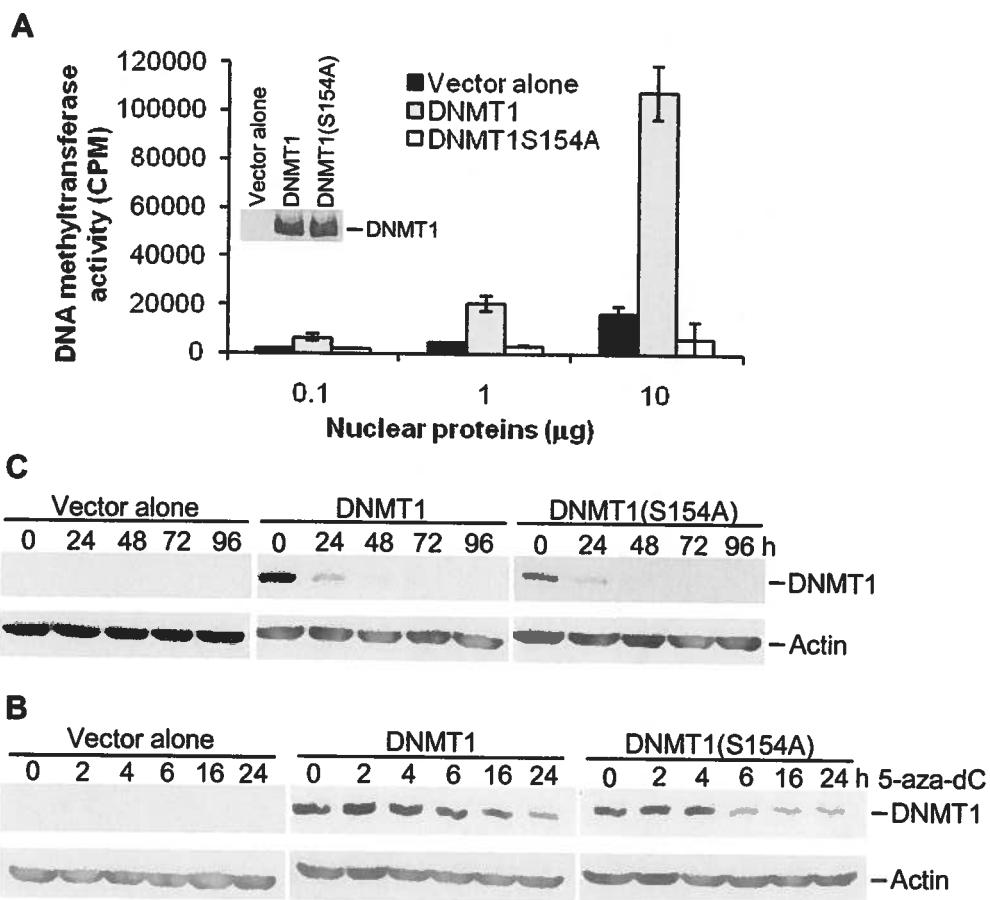
# Figure 2



# Figure 3



# Figure 4



## **CHAPITRE IV**

### **DISCUSSION GÉNÉRALE ET CONCLUSION**

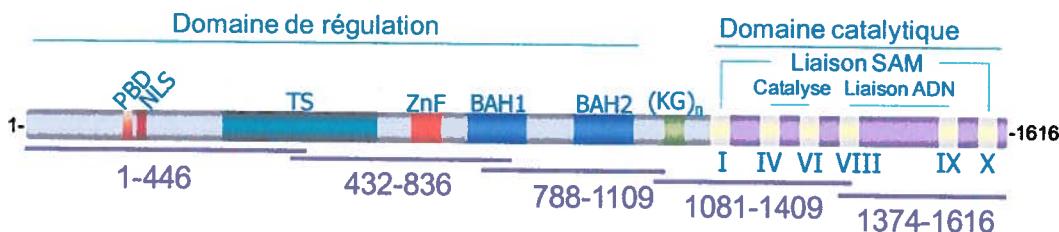
## **1. Rappel des objectifs de recherche**

La méthylation de l'ADN est la modification épigénétique la plus étudiée et joue un rôle essentiel dans le développement, le contrôle de l'expression des gènes ainsi que dans diverses maladies, comme le cancer. Les patrons de méthylation du génome sont maintenus lors de la réPLICATION de l'ADN par la DNMT1, la plus abondante méthyltransférase dans les cellules somatiques. La DNMT1 est une protéine unique par sa structure, mais aussi par sa régulation complexe. Jusqu'à maintenant, il a été démontré que la DNMT1 humaine subit diverses modifications post-traductionnelles, telles que l'ubiquitination, la méthylation et la phosphorylation. Grâce à des études visant à analyser le phosphoprotéome cellulaire, la phosphorylation d'un grand nombre de résidus sérines et thréonines de DNMT1 a été observée dans différents types cellulaires et conditions physiologiques. La nature des kinases responsables de cette phosphorylation ainsi que ses effets sur la biologie de l'enzyme restent cependant encore peu étudiés. Étant donné l'importance des effets de la phosphorylation sur les protéines, entre autres sur leur activité, stabilité et localisation cellulaire, il est possible que ces aspects de la DNMT1 soient affectés par la phosphorylation de résidus spécifiques. Les travaux de la présente thèse visaient donc à identifier des sérine/thréonine kinases capables de phosphoryler la DNMT1 humaine et à étudier les effets de cette phosphorylation sur les fonctions de l'enzyme. Nous avons par conséquent identifié les PKC et les CDK comme des familles de kinases capables de phosphoryler la DNMT1. Nos travaux ont démontré que : 1) la phosphorylation de DNMT1 par les PKC et les CDK cible préférentiellement le domaine N-terminal; 2) la phosphorylation de DNMT1 par les PKC est spécifique à certains isoformes; 3) la surexpression de PKC $\zeta$  et de DNMT1 dans la cellule conduit à une réduction du niveau de méthylation du génome; 4) la phosphorylation de DNMT1 par PKC $\zeta$  réduit son activité méthyltransférase de l'ADN; 5) les CDK1, 2 et 5 phosphorylent la Ser154 de DNMT1; et 6) la Ser154 de DNMT1 est importante pour son activité méthyltransférase de l'ADN et sa stabilité.

## **2. Utilisation des fragments de DNMT1**

Afin de démontrer la phosphorylation de la DNMT1 humaine par les PKC et par les CDK, nous avons utilisé des fragments de la protéine DNMT1 fusionnés à la GST (Glutathione S-transferase) (Figure 1). La DNMT1 est une protéine de 1616 acides aminés et l'étude de sa phosphorylation à partir de ces fragments a permis de cibler certaines régions. En effet, la portion

de 1-446 acides aminés est préférentiellement phosphorylée par les PKC et les CDK. Ces fragments nous ont également servi à démontrer une interaction directe entre DNMT1 et PKC $\zeta$ , ainsi qu'entre DNMT1 et CDK5. Un inconvénient de l'utilisation de tels outils est la présence de bandes contaminantes qui pourraient aussi être phosphorylées et ainsi fausser les résultats. Il est cependant bien connu que la région N-terminale de la DNMT1 est impliquée dans sa dégradation [256, 604]. Nous avons d'ailleurs identifié par spectrométrie de masse les protéines provenant de certaines des bandes contaminantes et elles correspondent bien à la protéine DNMT1 (**Annexe 3A et B**). De plus, un anticorps spécifique à la portion N-terminale de DNMT1 reconnaît ces mêmes bandes (**Annexe 3C**). Ces résultats confirment donc la présence de DNMT1 dans ces bandes, probablement une conséquence de la dégradation protéique.



**Figure 1.** Représentation schématique des différentes régions correspondantes aux fragments de DNMT1 fusionnés à la GST. Ces fragments ont été utilisés pour les essais kinases et les expériences de liaisons directes. PBD, site de liaison à PCNA; ZnF, domaine à doigt de zinc; NLS, signal de localisation nucléaire; TS, séquence de ciblage aux foyers de réplication; BAH, domaines bromo adjacent homology; KG, région charnière riche en lysine/glycine.

Un autre point important concernant l'utilisation de fragments protéiques pour l'étude de la phosphorylation, est la possibilité que les sites phosphorylés ne soient pas accessibles sur la protéine complète. En effet, il est possible que le repliement de la protéine entière ne permette pas la phosphorylation de certains résidus phosphorylés sur les fragments. Ceci ne peut cependant pas être confirmé, puisqu'aucune analyse de la structure cristallographique de la DNMT1 complète n'a été effectuée jusqu'à ce jour. Il est par contre évident que l'étude de la phosphorylation d'une grosse protéine telle que DNMT1 peut grandement être facilitée par sa division en des domaines plus petits [275]. Il est d'ailleurs possible que la structure relâchée du domaine N-terminal de DNMT1 puisse permettre le grand nombre d'interactions protéiques ainsi que le repliement indépendant de sous-domaines séparés [271, 605]. Ceci est basé sur des observations démontrant que des segments isolés de la région N-terminale de DNMT1 peuvent tout de même se lier à l'ADN [270-272] ou interagir avec des protéines qui lient la DNMT1 complète [606]. De plus, il est estimé que des fragments protéiques de plus de 100 acides aminés

forment une structure secondaire très similaire à leur structure native [607]. Les fragments de DNMT1 utilisés dans la présente thèse comprennent tous plus de 200 acides aminés. Ils ont également été utilisé par l'équipe du Dr. Pradhan afin de démontrer une interaction entre DNMT1 et les DNMT3a et DNMT3b [99], p53 [261] et G9a [317], ainsi que pour la méthylation par la SET7 [320]. Il est alors possible de penser que ces fragments puissent se replier de manière semblable à la structure native de la DNMT1 complète. Nous pouvons donc conclure que l'utilisation des fragments protéiques de DNMT1 est un bon outil pour l'étude de sa phosphorylation *in vitro* et de son interaction avec d'autres protéines.

### 3. Régulation de la DNMT1 par les PKC

Une étude récente, utilisant des inhibiteurs à larges spectres, a démontré l'implication des PKC dans la phosphorylation de DNMT1 dans les gliomes, sans toutefois avoir identifié d'isoformes particuliers [358]. Dans la présente thèse, nous avons comparé l'habileté de différents isoformes de PKC à phosphoryler la DNMT1. Nos résultats indiquent que la phosphorylation de la DNMT1 par les PKC est spécifique à certains isoformes. Effectivement, PKC $\epsilon$  phosphoryle peu ou pas DNMT1, tandis que les PKC $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\eta$  et  $\zeta$  la phosphorylent avec des efficacités variées. La phosphorylation différentielle par les PKC est un phénomène qui a déjà été observé auparavant. Il a été démontré que la phosphorylation de la Ser1674 de Ca $v$ 1.2  $\alpha_{Ic}$ , mais pas de la Ser1928, est spécifique à certains isoformes de PKC [608]. En effet, les PKC $\alpha$ ,  $\beta$ I,  $\beta$ II,  $\gamma$ ,  $\delta$  et  $\theta$  sont capables de phosphoryler ce site, tandis que les PKC $\epsilon$ ,  $\zeta$  et  $\eta$  en sont incapables [608]. La raison pour laquelle PKC $\epsilon$  ne phosphoryle pas la DNMT1 n'est cependant pas connue. Il est possible que cela implique un domaine spécifique à certains isoformes de PKC. De façon intéressante, des études antérieures utilisant des chimères ont permis de déterminer le rôle de certains domaines dans la localisation, la translocation et les fonctions biologiques des PKC [609-612]. En effet, il a été démontré que des chimères PKC $\delta$  possédant le domaine catalytique ou de régulation de PKC $\epsilon$  permettaient la transformation des cellules NIH3T3, mais de façon moins efficace que PKC $\epsilon$  [610]. Il a également été démontré que des chimères de PKC $\delta$  et de PKC $\alpha$  possédant le domaine de régulation de PKC $\epsilon$  augmentaient la prolifération des cellules NIH3T3 en présence ou en absence de PMA [612]. Enfin, des chimères du domaine V5 de PKC $\epsilon$  et PKC $\delta$  ont permis de démontrer l'implication de ce domaine dans les fonctions apoptotiques et dans la localisation nucléaire de PKC $\delta$ , suggérant des rôles isoformes-spécifiques

essentiels [609]. Des expériences mettant en jeu la construction de chimères entre la PKC $\epsilon$  et la PKC $\eta$ , par exemple, pourraient donc être indicatives sur les domaines impliqués dans l'interaction avec DNMT1, de même que dans sa phosphorylation. L'identification de ces régions pourrait par la suite être utile dans le développement de nouveaux inhibiteurs spécifiques pour certains isoformes de PKC.

Nous avons également démontré que les PKC phosphorylent préférentiellement les premiers 446 acides aminés de la région N-terminale de DNMT1. Ceci corrèle avec des résultats précédents qui montraient une phosphorylation préférentielle de la Ser127 par les PKC [358]. Bien que la phosphorylation par les PKC semble cibler la portion 1-446 acides aminés, le domaine C-terminal est aussi phosphorylé, mais de façon moins importante (**Annexe 4**). On retrouve d'ailleurs quelques sites de phosphorylation potentiels pour les PKC sur la région C-terminale de DNMT1 (**Chapitre I, Tableau VI**). La phosphorylation du domaine catalytique de DNMT1 pourrait avoir différents effets sur l'enzyme, tels qu'une modification de son activité enzymatique ou encore de sa liaison à l'ADN. D'autres expériences sont toutefois nécessaires afin de le déterminer.

L'utilisation de la PKC $\zeta$  comme modèle pour la suite des travaux provient du fait qu'elle a été une des premières PKC détectées dans le noyau cellulaire [409, 490]. Effectivement, dans les cellules PC12, la PKC $\zeta$  est retrouvée dans la matrice nucléaire interne en réponse au NGF [409, 490], là où la réPLICATION de l'ADN, l'expression des gènes et la phosphorylation s'effectuent [613]. Les PKC pourraient donc faire partie intégrante d'une voie permettant la communication des signaux en provenance de la membrane plasmique au noyau cellulaire. Bien que la PKC $\zeta$  ne soit pas la plus efficace pour la phosphorylation des fragments de DNMT1, elle se compare à PKC $\alpha$  et  $\delta$  lorsque la DNMT1 recombinante est utilisée comme substrat dans un essai de phosphorylation *in vitro* (**Chapitre II, Figure 1**).

Il est possible que les isoformes de PKC ciblent des résidus séries et thréonines différents, ou encore qu'un même résidu soit phosphorylé par plusieurs isoformes. En plus de se distinguer par leur structure et leur activation, les PKC se différencient par le site consensus de phosphorylation de leurs substrats. Les PKC phosphorylent préférentiellement des séries et des thréonines comprises dans des séquences dont le motif est basophile, où la S/T à phosphoryler se trouve flanquée par une Arg ou une Lys, typiquement en amino-terminal du phospho-récepteur [614]. Une étude basée sur les séquences des sites phosphorylés et sur l'utilisation de peptides

synthétiques a identifié le site consensus de phosphorylation général des PKC comme étant  $RXXS/TXRX$ , où  $X$  indique n'importe quel acide aminé [615]. Par la suite, Nishikawa et ses collègues (1997) [616] ont déterminé les peptides substrats optimaux pour neuf des isoformes de PKC humains ( $\alpha$ ,  $\beta I$ ,  $\beta II$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\varepsilon$ ,  $\eta$ ,  $\mu$  et  $\zeta$ ). Cette étude a permis de démontrer que tous les isoformes de PKC phosphorylent préférentiellement des peptides avec des acides aminés hydrophobes en position +1 et basiques en position -3 de la S/T phosphorylée. De plus, tous les isoformes, excepté PKC $\mu$  qui n'est d'ailleurs pas un membre de la famille des PKC, choisissent des peptides comprenant des acides aminés basiques en positions -6, -4 et -2 [616]. Des différences sont néanmoins observées pour certains isoformes. Par exemple, la classe des cPKC ( $\alpha$ ,  $\beta I$ ,  $\beta II$ ,  $\gamma$ ) se distingue des autres classes par sa préférence pour des substrats avec des acides aminés basiques en positions +1 et +3 [616]. Pour les classes nPKC et aPKC, c'est plutôt des résidus hydrophobes qui sont préférés aux positions +1 et +3 [616]. L'analyse *in silico* des sites de phosphorylation de DNMT1 peut donc aider à identifier certains résidus potentiellement phosphorylés par les PKC. Cette méthode reste cependant subjective, puisqu'il est possible que certains sites identifiés ne soient pas phosphorylés dans la cellule. Il est également possible que certains sites phosphorylés par les PKC dans la cellule ne soient pas identifiés dans cette analyse. Ceci est notamment le cas pour la Ser127, phosphorylée par les PKC dans les gliomes humains et murins [358], mais qui n'est pas présente dans notre analyse *in silico*. Cette discordance peut s'expliquer par le fait que la séquence entourant la Ser127 (DANSPPK) ne correspond pas parfaitement à la séquence du site consensus préféré par les PKC. En tenant compte de ce fait, le nombre de sites potentiels de DNMT1 phosphorylés par les PKC présentés dans le **Tableau VI (Chapitre I)** est probablement sous-estimé.

Nous avons voulu identifier, par la technique de spectrométrie de masse, les sites de phosphorylation de la DNMT1 recombinante ciblés par la PKC $\zeta$ . Malheureusement, certaines difficultés techniques, telles que l'isolation de peptides phosphorylés et la présence d'un agent contaminant dans le tampon de la DNMT1 recombinante, n'ont pas permis leur identification. Une alternative à l'utilisation de la DNMT1 recombinante serait d'immunoprecipiter la DNMT1 endogène ou exogène à partir de lysats nucléaires avec l'aide d'un anticorps spécifique et de l'utiliser dans un essai de phosphorylation *in vitro*. Nous avons par ailleurs effectué des mutations ponctuelles de certains résidus présentés dans le **Tableau VI (Chapitre I)** sur le fragment 1-446 acides aminés de DNMT1. Nous n'avons cependant pas observé de différences significatives

dans les niveaux de phosphorylation de DNMT1 par la PKC $\zeta$  comparé au fragment de type sauvage (résultats qui ne sont pas montrés dans cette thèse). L'immunoprécipitation de DNMT1 et l'utilisation d'un anticorps spécifique reconnaissant les substrats phosphorylés par les PKC serait une approche intéressante. Elle fournirait une indication de la phosphorylation de DNMT1 par les PKC dans la cellule. Il n'existe toutefois qu'un anticorps spécifique aux séries phosphorylées des substrats des cPKC et nPKC, excluant les thréonines et les aPKC, rendant cette approche moins attrayante. L'utilisation de peptides synthétiques comprenant les Ser et Thr de DNMT1 potentiellement phosphorylées par les PKC dans des essais de phosphorylation *in vitro* pourrait être une autre méthode alternative (criblage). De cette façon, il serait possible d'identifier des sites phosphorylés *in vitro* par les PKC, et par la suite, de confirmer leur phosphorylation sur la DNMT1 complète. Ceci pourrait être effectué, par exemple, par la production d'un anticorps spécifique reconnaissant un résidu phosphorylé. La production d'une DNMT1 mutée sur ce site en un résidu alanine non-phosphorylable pourrait également aider à la confirmation. De tels outils pourraient permettre d'étudier la phosphorylation de DNMT1 dans la cellule, et de déterminer à quels moments dans le cycle cellulaire et en réponse à quels stimuli elle devient phosphorylée sur les sites identifiés.

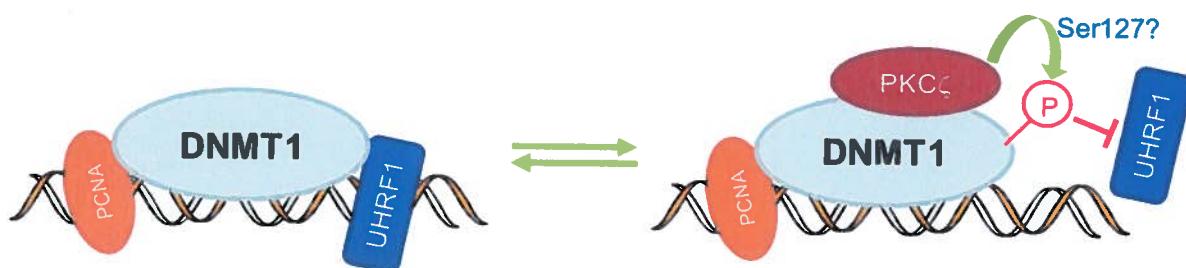
Afin de déterminer l'effet de l'interaction entre PKC $\zeta$  et DNMT1 sur la méthylation de l'ADN, nous avons d'abord utilisé une approche « gènes spécifiques ». Nous avons sélectionné des gènes d'intérêts pour le laboratoire, la plupart étant modulés par la méthylation de l'ADN (**Annexe 5A**). Ceux-ci auraient pu nous servir d'outils dans le cadre de mon projet. Nous avons donc vérifié si la surexpression de PKC $\zeta$  pouvait avoir un effet sur l'expression de certains de ces gènes, avec ou sans traitement à la 5-aza-dC. Malheureusement, aucune modulation significative de leur expression en ARNm suite à la surexpression de PKC $\zeta$  n'a été observée dans les cellules HEK-293 (**Annexe 5B**). Nous avons alors décidé de poursuivre avec une approche plus globale. Pour ce faire, nous avons utilisé la technique d'immunoprecipitation de la chromatine suivie d'une hybridation sur une matrice d'ADN (ChIP-on-Chip) contenant les promoteurs et une partie de la région codante de 25000 gènes (Affymetrix). Avec l'aide d'un anticorps reconnaissant les cytosines méthylées de l'ADN, il a donc été possible d'identifier des régions précises du génome dont la méthylation de l'ADN était modulée par l'interaction/phosphorylation entre PKC $\zeta$  et DNMT1. Nous avons observé une hypométhylation du génome lorsque DNMT1 et PKC $\zeta$ , mais pas PKC $\zeta$  seule, étaient surexprimés dans la cellule. Le fait que la surexpression de PKC $\zeta$  seule

ne soit pas suffisante pour induire l'hypométhylation du génome peut être expliquée, en partie, par la présence en excès de PKC $\zeta$  comparé à la DNMT1 endogène. La portion de PKC $\zeta$  non-liée à DNMT1 dans la cellule pourrait potentiellement activer des voies de signalisation critiques pour la prolifération, différenciation et survie cellulaire, comme la voie des MAPK. Il est d'ailleurs bien connu que PKC $\zeta$  est capable d'activer la voie des MAPK dans différents types cellulaires [491, 617, 618]. L'activation de cette voie par PKC $\zeta$  pourrait alors contrebalancer la régulation négative de DNMT1. Il a été démontré que l'inhibition de la voie ERK/MAPK conduisait à une réduction du niveau de méthylation dans des cellules de cancer du colon [292]. De plus, il a été démontré que le traitement de cellules de cancer de la prostate avec des inhibiteurs d'HDAC (HDACi) menait à l'inhibition de la voie ERK/MAPK [619]. L'inhibition de l'activité de ERK causait par la suite une réduction du niveau protéique de DNMT1, menant à une diminution de la méthylation de l'ADN [619]. Il semblerait donc que l'activation de la voie ERK/MAPK soit importante pour le maintien de la méthylation de l'ADN et pourrait impliquer les PKC.

L'hypométhylation de l'ADN que nous avons observée lorsque DNMT1 et PKC $\zeta$  étaient surexprimés dans la cellule n'est pas restreinte aux promoteurs des gènes. On retrouve également une hypométhylation dans la région codante de plusieurs gènes. Ces changements dans le statut de méthylation pourraient cependant ne pas être suffisants afin d'induire ou de moduler l'expression des gènes. Par exemple, nous n'avons pas observé de modulation significative des ARNm de *Egr1*, *Timp-3* et *MMP-9* (**Annexe 6A, B et C**) après surexpression de PKC $\zeta$  et de DNMT1, les deux premiers gènes ayant été identifiés dans notre analyse. Ceci n'est cependant pas surprenant puisque l'hypométhylation au niveau des promoteurs ne corrèle pas toujours avec l'augmentation de l'expression des gènes [620-622]. Bien que, dans les cellules cancéreuses, l'hypométhylation de l'ADN soit observée au niveau de gènes spécifiques, ses effets les plus importants sont causés par l'activation des transposons et des rétrovirus endogènes présents dans le génome humain [158]. L'analyse du niveau de méthylation des rétrotransposons, telles que LINE et SINE, permettrait de déterminer si l'hypométhylation de l'ADN, observée lorsque DNMT1 et PKC $\zeta$  sont surexprimés dans la cellule, touche également les régions répétitives. Par exemple, ceci pourrait être vérifié directement par un séquençage au bisulfite [623] ciblant les séquences répétitives telle que LINE1.

La phosphorylation des protéines est une modification post-traductionnelle dont les effets sur les substrats sont variés et importants pour plusieurs aspects. Jusqu'à maintenant, la

phosphorylation de DNMT1 (humaine et murine) par les kinases a été démontrée comme étant importante pour sa stabilité, sa liaison à l'ADN, son activité enzymatique et ses interactions protéiques [315, 322, 345, 358]. Bien que nos résultats ne démontrent pas que l'hypométhylation du génome observée soit un effet direct de la phosphorylation de DNMT1 par PKC $\zeta$ , ils suggèrent néanmoins qu'elle serait impliquée dans le processus. En effet, la diminution de l'activité enzymatique *in vitro* de DNMT1 suite à sa phosphorylation par PKC $\zeta$  supporte cette hypothèse. La phosphorylation de DNMT1 par les PKC pourrait alors affecter, par exemple, les interactions domaine-domaine, réduisant l'efficacité catalytique de l'enzyme. Il est également possible que la phosphorylation de DNMT1 par les PKC dans la cellule puisse moduler ses interactions avec d'autres protéines. Il est bien connu que PCNA interagit avec DNMT1 et permet son accumulation au niveau des foyers de réPLICATION de l'ADN [250]. Nous avons vérifié si cette interaction pouvait être modulée par la phosphorylation de DNMT1 par PKC $\zeta$ . Il semble toutefois que cela ne soit pas le cas, tel que démontré par un « pull-down » GST (Annexe 7). Notre résultat est d'ailleurs consistant avec celui obtenu récemment par Hervouet et ses collègues [358]. Ce groupe démontre que la phosphorylation de la Ser127 de DNMT1 par les PKC n'empêche pas la liaison de PCNA à DNMT1, mais plutôt de UHRF1 à DNMT1. Il serait donc intéressant de vérifier si la phosphorylation de DNMT1 par PKC $\zeta$  influence sa liaison avec UHRF1 et si la Ser127 est la sérine ciblée (Figure 2). Un bon nombre de protéines interagissent avec DNMT1 au niveau de la région N-terminale et leur interaction pourraient également être régulée par la phosphorylation par les PKC. D'autres études sont cependant nécessaires afin de le déterminer.



**Figure 2.** Modèle hypothétique de la phosphorylation de DNMT1 par PKC $\zeta$  affectant la liaison de UHRF1. Dans la cellule, la liaison de DNMT1 avec UHRF1 et PCNA est nécessaire à son rôle de maintenance de la méthylation de l'ADN. Lorsque DNMT1 devient phosphorylée par PKC $\zeta$ , possiblement sur la Ser127, il y a rupture de la liaison de DNMT1 avec UHRF1, mais pas avec PCNA.

Une autre conséquence connue de la phosphorylation de la DNMT1 est la modulation de sa liaison à l'ADN. Il a en effet été démontré que la phosphorylation de la DNMT1 murine par

CKI $\delta/\epsilon$  diminuait son affinité à l'ADN [315]. Dans cette perspective, nous avons émis comme hypothèse que la phosphorylation de DNMT1 par les PKC pourrait peut-être moduler sa liaison à l'ADN. Pour ce faire, nous avons utilisé la technique ICM (*In vivo* complex of methylation assay). Cette technique consiste en l'analyse indirecte de l'activité méthyltransférase de l'ADN par la capture de la DNMT1 liée à l'ADN suivant le traitement des cellules à la 5-aza-dC [624]. Dans une première série d'expériences, nous avons observé la liaison de DNMT1 à l'ADN lorsque les cellules HEK-293 étaient traitées à la 5-aza-dC (Annexe 8). Une faible quantité de DNMT1 endogène, phosphorylée par les PKC sur les résidus sérines, a également été détectée (difficilement visible, Annexe 8). Il serait peut-être possible d'augmenter ce signal par la surexpression de DNMT1 dans la cellule. De cette façon, nous pourrions effectuer diverses expériences de co-expression avec les PKC. Jumelées à des traitements utilisant des inhibiteurs spécifiques de PKC, ces expériences nous permettraient de déterminer si l'on observe des changements dans la liaison de DNMT1, phosphorylée ou non, à l'ADN. Une approche alternative utilisant de l'ADN lié à de la cellulose [315], pourrait également permettre de déterminer si la phosphorylation de DNMT1 par les PKC module sa liaison et/ou sa dissociation à l'ADN. Un inconvénient associé à cette technique est l'évaluation *in vitro* de la liaison de protéines à l'ADN et par conséquent, cela ne reflète pas nécessairement les événements qui ont lieu dans la cellule.

#### 4. Régulation de la DNMT1 par les CDK

En plus d'avoir démontré que la DNMT1 était phosphorylée par les CDK, nous avons identifié la sérine 154 comme un site de phosphorylation ciblé par les CDK1, 2 et 5. Bien que la GSK-3 $\beta$  ait été identifiée comme une kinase candidate pour la phosphorylation de la Ser154 (Chapitre I, Tableau VI), celle-ci ne phosphoryle cependant pas ce résidu de DNMT1 *in vitro*. Ce résultat suggère que la phosphorylation de la Ser154 est hautement spécifique aux CDK. Les CDK ciblent une séquence consensus sur leurs substrats correspondante à S/T-P-X-K/R, où S et T sont les résidus sérine et thréonine phosphorylés, P est le résidu proline obligatoire en position +1 et X correspond à n'importe quel acide aminé [625]. Même si les CDK montrent une préférence pour un résidu basique en position +3, la phosphorylation d'une sérine ou thréonine suivie de la proline obligatoire et d'un autre acide aminé à cette position n'est pas exclue [626]. De façon intéressante, les acides aminés entourant la Ser154 (SPSPRIT) sont très près de la

séquence consensus des CDK. Nous avons démontré, par l'inhibition spécifique via la Roscovitine, que les CDK1, 2 et 5 étaient responsables de la phosphorylation de la Ser154 dans les cellules HEK293. Une quantification des résultats de la **Figure 2D** (**Chapitre III**) est représentée à l'**Annexe 9A**. Il est toutefois possible que d'autres membres de la famille des CDK puissent phosphoryler ce résidu étant donné que le site consensus de phosphorylation est conservé parmi les CDK. Un mécanisme majeur régulant la spécificité de substrat des CDK est l'interaction à différents partenaires protéiques [627]. Par exemple, les cyclines E et A possèdent une poche hydrophobique, M-R-A-I-L, qui permet la reconnaissance et l'interaction à des substrats possédant un motif cy R-X-L (motif de liaison de cycline (cy)) [628, 629]. De plus, on retrouve les cyclines A et E actives dans le noyau cellulaire [630], tandis que la cycline B fait l'aller-retour entre le noyau et le cytoplasme [631, 632]. Il est donc possible que le partenaire de liaison rende la phosphorylation de DNMT1 spécifique aux CDK1, 2 et 5. Ceci pourrait être déterminé par des essais de phosphorylation *in vitro* utilisant la DNMT1 et des CDK associées à divers partenaires de liaison. L'analyse de la phosphorylation de la Ser154 de DNMT1 suite à l'inhibition de cyclines et CDK spécifiques, avec l'aide d'ARN interférants par exemple, pourrait également être effectuée dans la cellule. Il serait aussi intéressant d'analyser la phosphorylation de la Ser154 de DNMT1 à travers le cycle cellulaire et ainsi vérifier sa modulation. Cela permettrait d'obtenir des informations sur l'identité des CDK et des partenaires de liaison impliqués dans la phosphorylation de DNMT1. Comme les CDK1 et CDK2 jouent des rôles importants dans la progression et le contrôle du cycle cellulaire, il est pertinent de penser que la phosphorylation de DNMT1 puisse être régulée.

Le fait que nous avons démontré une interaction entre CDK5 et DNMT1 dans les cellules HEK-293 suggère un rôle pour cette CDK dans le contrôle de la méthylation de l'ADN. Un rôle jusqu'à maintenant inconnu, qui pourrait être l'une des raisons expliquant l'expression ubiquitaire de CDK5 dans les tissus. Le partenaire de liaison à CDK5 impliqué dans cette interaction reste cependant à être identifié. Étant donné que les partenaires d'interaction p35, p39 et p25 sont essentiellement exprimés dans les cellules neuronales, il est probable que, dans d'autres types cellulaires, les cyclines D et E soient impliquées dans la phosphorylation de DNMT1. CDK5 a jusqu'à maintenant été étudiée principalement dans les cellules neuronales et pourrait également avoir un rôle à jouer dans le contrôle de la méthylation de l'ADN dans ce type cellulaire. Des études ont démontré l'hyperméthylation de certains gènes et l'inhibition de leur

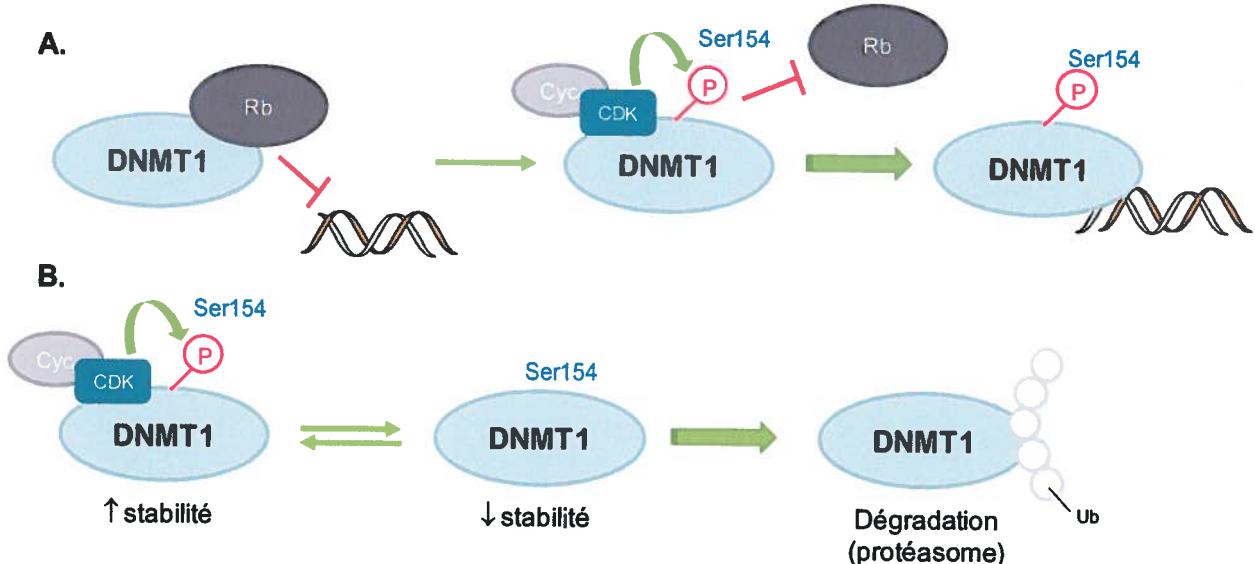
expression dans des maladies neurodégénératives comme l’Alzheimer [633, 634]. Il est possible qu’une augmentation de l’activité de CDK5 dans les cellules neuronales puisse augmenter l’activité méthyltransférase de l’ADN et mener à l’hyperméthylation du génome. La surexpression de CDK5 est d’ailleurs fréquemment observée dans ce type de maladie [571, 572] et pourrait être en partie responsable du dérèglement du niveau de méthylation de l’ADN [635]. L’étude du rôle possible de la phosphorylation de DNMT1 par CDK5 dans la progression de maladies neurodégénératives comme l’Alzheimer pourrait donc être envisagée. CDK5 possède également un rôle dans la plasticité neuronale et la mémoire [573]. Comme il est de plus en plus évident que la méthylation de l’ADN joue un rôle dans l’établissement de la mémoire et dans la plasticité neuronale chez l’adulte [636], il serait intéressant d’étudier le rôle possible de CDK5 dans ces processus, en lien avec la modulation de la méthylation de l’ADN via la phosphorylation de DNMT1.

La phosphorylation par les CDK de séries et thréonines de DNMT1, autres que la Ser154, est également possible. On observe notamment ce phénomène pour la protéine Rb, qui est phosphorylée à différents sites par les CycD1/CDK4 et CycE/CDK2 afin de réguler divers aspects de son activité d’inhibition de la transcription [637]. Plusieurs autres résidus séries et thréonines de DNMT1 pourraient donc être ciblés par les CDK, comme le fait était le **Tableau VI (Chapitre I)**. Il est possible d’envisager que la DNMT1 soit régulée tout au long du cycle cellulaire par la phosphorylation simultanée et/ou séquentielle de divers résidus séries et thréonines par différentes CDK. Cette régulation pourrait notamment agir au niveau de l’activité enzymatique, des interactions protéiques ou encore de la localisation cellulaire de la DNMT1.

Nos résultats démontrent que la phosphorylation de la Ser154 joue un rôle important dans l’activité de la DNMT1. En effet, la mutation de la Ser154 en alanine réduit drastiquement l’activité méthyltransférase de l’ADN de la DNMT1 dans un lysat cellulaire comparé à la forme sauvage. Bien que *in vitro*, la DNMT1 humaine possède toujours sa fonction de méthyltransférase de l’ADN suite à la délétion des 580 premiers acides aminés [272], il est tout de même possible que la mutation d’un seul acide aminé affecte son activité dans un lysat cellulaire. La complexité d’un lysat cellulaire, en termes de présence de partenaires de liaison de DNMT1 et d’ADN génomique, se distingue grandement de la pureté de l’utilisation de protéines recombinantes dans un essai enzymatique. En effet, certains facteurs, absents lors d’un essai enzymatique *in vitro* utilisant la DNMT1 recombinante, pourraient être nécessaires afin de

déetecter l'effet de la mutation de la Ser154 sur son activité. Il a récemment été démontré par mutagenèse régionale (Regional frame-shift mutagenesis; RFM) que la portion 124-160 acides aminés est essentielle pour l'activité de la DNMT1 murine [638]. De façon intéressante, on retrouve la sérine orthologue à la Ser154 humaine dans cette séquence, soit la Ser152, que l'on retrouve d'ailleurs constitutivement phosphorylée chez la souris [639]. Comme la Ser154 est séparée du site catalytique par 985 acides aminés, il est probable que la phosphorylation de celle-ci influence les interactions domaine-domaine de DNMT1 ou encore l'interaction avec certaines protéines. Nos résultats indiquent que la liaison de PCNA à DNMT1 n'est pas affectée par la phosphorylation de la Ser154. Ceci pourrait cependant être le cas pour d'autres protéines, comme UHRF1 et Rb par exemples. Il a été démontré que Rb interagit avec DNMT1 au niveau des 336 premiers acides aminés et que cette interaction empêche la liaison de DNMT1 à l'ADN [204]. Comme la surexpression de Rb dans la cellule conduit à l'hypométhylation du génome, cette même étude émet comme hypothèse que Rb pourrait réguler l'activité de DNMT1 durant le cycle cellulaire [204]. Par conséquent, il serait intéressant de regarder l'effet de la phosphorylation de la Ser154 sur l'interaction de Rb à DNMT1. Durant le cycle cellulaire, l'activation des CDK par les cyclines permettrait la phosphorylation de la Ser154 de DNMT1. Ceci empêcherait la liaison de Rb à DNMT1, laissant celle-ci effectuer son rôle de maintenance de la méthylation de l'ADN (**Figure 3A**). Au contraire, lorsque les cyclines sont dégradées et que les CDK sont inactivées, la réduction de la phosphorylation de la Ser154 de DNMT1 permettrait la liaison de Rb. Cette interaction inhiberait ainsi la liaison de DNMT1 à l'ADN et donc, son activité méthyltransférase de l'ADN. L'hypothèse proposant une régulation de la méthylation de l'ADN lors du cycle cellulaire par la modification post-traductionnelle de DNMT1 est très intéressante, mais reste cependant à être démontrée. Une étude suggère d'ailleurs une hypothèse similaire, mais impliquant la Ser515 de la DNMT1 murine [345]. Le groupe de Goyal et ses collègues [345] a mis en évidence l'importance de la phosphorylation de la Ser515 pour l'activité méthyltransférase de DNMT1 via la maintenance de l'interaction domaine-domaine de l'enzyme. L'incubation de DNMT1 avec un peptide correspondant à la séquence entourant la Ser515, inhibe l'activité de DNMT1 si celui-ci est phosphorylé [345]. Le groupe interprète ce résultat par le fait que le peptide phosphorylé lie le site d'interaction situé dans le domaine C-terminal de DNMT1 et empêche l'interaction du domaine N-terminal au site catalytique. Il est possible que le même phénomène puisse être observé pour la Ser154. La régulation de DNMT1 pourrait alors être

importante pour l'inactivation de l'enzyme durant le cycle cellulaire. En dehors de la phase S, l'inhibition de DNMT1 empêcherait la méthylation de cytosines qui ne devrait normalement pas être méthylées en l'absence d'ADN hémiméthylé. Dans cette optique, nos résultats suggèrent que les CDK pourraient être d'importants régulateurs de la méthylation de l'ADN via la phosphorylation de DNMT1 lors du cycle cellulaire. Des résultats récents ont démontré que la phosphorylation de la Ser154 ainsi que des Ser141, Ser143 et Ser591 était modulée suite à la différentiation des cellules embryonnaires souches humaines induite par le PMA [355]. Il serait donc intéressant d'étudier la phosphorylation de la Ser154 à travers le cycle cellulaire afin de déterminer si elle subit une modulation, ou si, comme son orthologue chez la souris, elle est plutôt constitutivement phosphorylée.



**Figure 3.** Effets possibles de la phosphorylation de la Ser154 de DNMT1 par les CDK sur son interaction avec d'autres protéines et sa stabilité. **A)** La liaison de Rb à DNMT1 inhibe sa capacité de liaison à l'ADN. La phosphorylation de DNMT1 par les CDK sur la Ser154 empêche la liaison de Rb à DNMT1, permettant ainsi sa liaison à l'ADN. **B)** La phosphorylation de DNMT1 par les CDK au niveau de la Ser154 la protège contre la dégradation via l'ubiquitine-protéasome, assurant une stabilité protéique.

La Ser154 pourrait également être importante pour la stabilité de la protéine DNMT1, puisque nos résultats indiquent que la dégradation de la DNMT1(S154A) est plus rapide, en comparaison au type sauvage, après le traitement des cellules à la 5-aza-dC. Une quantification des résultats de la **Figure 4C (Chapitre III)** est représentée à l'**Annexe 9B**. Comme la dégradation de DNMT1 induite par la 5-aza-dC nécessite la voie de l'ubiquitine-protéasome [640], la phosphorylation de la Ser154 pourrait alors la protéger contre la dégradation via cette voie et ainsi lui procurer une plus grande stabilité (**Figure 3B**). Ceci pourrait être confirmé par

l'utilisation d'inhibiteurs de la voie protéasomale dans le même type d'expériences que nous avons effectuées. De façon intéressante, en plus d'avoir observé un effet sur l'activité de la DNMT1, le groupe D'Aiuto [638] a également démontré que la mutation de la région 124-160 acides aminés résultait en un taux de dégradation plus élevé de la protéine DNMT1 murine. Il serait intéressant d'investiguer plus en profondeur le rôle de la phosphorylation de la Ser154 sur la stabilité et l'activité *in vivo* de la DNMT1. Ceci pourrait être réalisé par l'établissement de lignées stables exprimant soit la DNMT1 de type sauvage ou la DNMT1(S154A) dans des cellules ES déficientes en DNMT1. De plus, ce modèle permettrait également d'étudier l'importance de la phosphorylation de la Ser154 dans un contexte de différenciation cellulaire.

## 5. Implications des autres familles de kinases et des phosphatases dans la phosphorylation de DNMT1

Comme un grand nombre de sites de phosphorylation ont été identifiés jusqu'à maintenant dans la littérature, il est possible que des kinases autres que les PKC, CDK et AKT phosphorylent la DNMT1 humaine. Basé sur le Tableau VI (Chapitre I), nous avons testé la capacité de plusieurs autres kinases à phosphoryler les différents fragments de DNMT1. Comme on peut le voir à l'Annexe 10A et B, la majorité des S/T kinases testées sont capables de phosphoryler les fragments de DNMT1 fusionnée à la GST, mais avec différentes préférences et efficacités. De façon intéressante GSK-3 $\beta$  semble avoir une préférence pour le fragment 663-1109. La Ser954 comprise dans ce domaine, ayant été identifiée dans la littérature comme étant un résidu de la DNMT1 humaine phosphorylé [338], pourrait possiblement être la cible de GSK-3 $\beta$ . De son côté, PDK1 phosphoryle très peu DNMT1 et ne semble avoir aucune préférence pour un fragment donné. Bien que cette kinase ait été observée dans le noyau cellulaire [641], elle se localise principalement dans le cytoplasme dans les cellules non-stimulées et à la membrane plasmique dans les cellules stimulées [642, 643]. PDK1 possède une activité basale élevée [644, 645] et on la retrouve en amont des voies de signalisation, ce qui en fait une candidate moins intéressante pour la phosphorylation de DNMT1 contrairement à ERK par exemple. Cette dernière semble d'ailleurs posséder une forte préférence pour les fragments de DNMT1 1-446 et 1081-1409 acides aminés. De plus, l'inhibition de la voie ERK/MAPK induit une hypométhylation du génome dans les cellules de cancer du colon [292] et de la prostate [619]. Il serait alors intéressant d'investiguer l'implication possible de la phosphorylation de DNMT1 par ERK dans

le contrôle de la méthylation de l'ADN. De son côté, la CaMKII $\alpha$  montre un patron de phosphorylation qui ressemble fortement à celui des PKC et des CDK. En effet, elle montre une préférence pour les fragments 1-446, 1081-1409 et 1373-1616 de DNMT1. C'est cependant la CKII qui semble phosphoryler le plus fortement DNMT1, principalement au niveau du fragment 1-446 et plus faiblement le fragment 431-836. Cette dernière est d'ailleurs une candidate intéressante étant donné son implication dans la différentiation, prolifération et survie cellulaire (**Tableau V, Chapitre I**). L'ensemble de nos résultats laissent présager que DNMT1 pourrait être phosphorylée par l'une de ces kinases, possiblement sur un résidu sérine ou thréonine déjà identifié dans la littérature.

Finalement, un moyen de réguler la phosphorylation de protéine est par la déphosphorylation. Ceci est effectué par des enzymes spécifiques appelées phosphatases. Il est donc vraisemblablement possible que la phosphorylation de DNMT1 par les diverses kinases soit régulée par la déphosphorylation. Les phosphatases possiblement impliquées pourraient être des phosphatases nucléaires, telle que certains membres de la famille des phosphoprotéines phosphatases (PPP). Les phosphatases PP1, PP2A, PP4 et PP5 pourraient être des candidates potentielles étant donné leur rôle, respectivement, dans la condensation des chromosomes, la cohésion des chromatides, la réparation de l'ADN et le stress cellulaire [646]. La déphosphorylation pourrait être un moyen efficace afin de contrôler, par exemple, l'activité de DNMT1 durant le cycle cellulaire ou encore sa stabilité lorsque celle-ci n'est pas requise dans la cellule. L'étude des phosphatases impliquées dans le contrôle de la phosphorylation de DNMT1 par les PKC et les CDK serait donc une perspective intéressante.

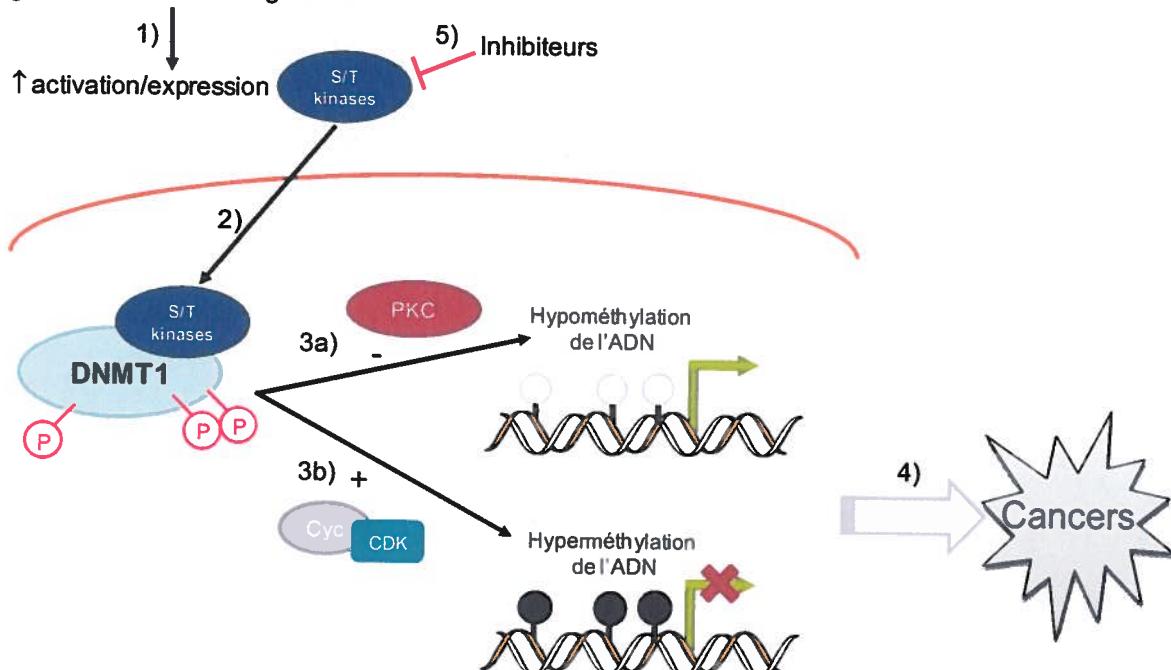
## **6. Modèle pour la phosphorylation de la DNMT1 par les PKC et les CDK et implication dans le cancer**

La régulation post-traductionnelle, tout comme les autres types de régulation de DNMT1, semble être un processus complexe, impliquant une variété de modifications. Ces différentes modifications semblent également agir séquentiellement ou en concert, affectant ainsi la DNMT1 à plusieurs niveaux. Il a été démontré que la balance entre l'ubiquitination et la méthylation [331, 332], ou encore, entre la phosphorylation et la méthylation de DNMT1 [322], dictait l'avenir de la protéine par la protection contre ou l'induction de la dégradation. Plus récemment encore, il a été démontré que SIRT1 (Silent mating type information regulation 2 homolog) s'associait à

DNMT1 et désacétylait plusieurs résidus lysine [647]. De façon intéressante, la désacétylation de différents résidus Lys de DNMT1 a des effets variés sur ses fonctions. Par exemple, la désacétylation des Lys1349 et Lys1415 augmente l'activité catalytique de DNMT1, tandis que la désacétylation de résidus Lys situés dans le domaine GK diminue sa fonction de répresseur transcriptionnel, indépendamment de son activité méthyltransférase de l'ADN [647]. Il est donc évident que les modifications post-traductionnelles de DNMT1 peuvent influencer de diverses façons la biologie de l'enzyme dépendamment de leur nature et de leur position. La phosphorylation de DNMT1 par Akt en est un excellent exemple. L'équipe du Dr. Pradhan [322] a démontré que la phosphorylation de la Ser143 de DNMT1 par Akt augmentait sa stabilité. De son côté, le groupe du Dr. Cartron [358] a plutôt démontré que la phosphorylation de la Ser143 et de la Ser127 par Akt induisait la rupture de la liaison entre DNMT1, PCNA et UHRF1, conduisant ainsi à une diminution du niveau de méthylation de l'ADN. Dans la présente thèse, nous avons démontré l'implication de deux familles de kinases, soient les PKC et les CDK, dans la régulation de la DNMT1 humaine par la phosphorylation. D'un côté, la phosphorylation de DNMT1 par les PKC, de façon isoforme-spécifique, mène à une réduction de son activité méthyltransférase de l'ADN et à la réduction du niveau de méthylation de l'ADN. D'un autre côté, la phosphorylation de la Ser154 par les CDK influence plutôt positivement l'activité de l'enzyme de même que sa stabilité. Les effets distincts de la phosphorylation de DNMT1 par ces deux familles de kinases pourraient donc réguler l'activité de DNMT1 sous différentes conditions. De même, dans un contexte d'initiation d'un cancer (**Figure 4**), la dérégulation des voies de signalisation pourrait conduire à une augmentation de l'expression ou de l'activité cellulaire de séries/thréonines kinases telles que les PKC et/ou les CDK. La dérégulation de ces kinases a d'ailleurs été associée à plusieurs reprises à différents types de cancers [371, 374, 544], reflétant leur rôle important dans une multitude de processus cellulaires, incluant la prolifération et la régulation du cycle cellulaire. L'augmentation de l'activité et/ou de l'expression des PKC et CDK mènerait alors à l'augmentation de la phosphorylation de DNMT1 qui affecterait de plusieurs façons l'enzyme et qui aurait également différentes conséquences sur le niveau de méthylation de l'ADN. Dans le cas où il y aurait dérégulation de la voie des PKC, la phosphorylation de DNMT1 causerait une réduction globale du niveau de méthylation de l'ADN, affectant possiblement les régions répétitives du génome et certains oncogènes. Au contraire, s'il y avait dérégulation des CDK, la phosphorylation de DNMT1 conduirait plutôt à l'augmentation

du niveau de méthylation de certaines régions du génome (hyperméthylation), touchant possiblement des gènes suppresseurs de tumeurs. L'hypométhylation et l'hyperméthylation du génome sont deux événements caractéristiques de plusieurs types de cancers [158, 648]. La dérégulation des PKC et/ou des CDK pourrait donc faire partie intégrante des processus d'initiation et de progression du cancer, par leur rôle dans la régulation de la DNMT1 par la phosphorylation et donc, par leur implication dans la régulation de la méthylation de l'ADN.

#### Dérégulation des voies de signalisation



**Figure 4.** Modèle général pour la phosphorylation de DNMT1 par les PKC et les CDK et son rôle possible dans l'initiation du cancer. Dans un contexte d'initiation d'un cancer, la dérégulation des voies de signalisation (1) pourrait conduire à une augmentation de l'expression ou de l'activité cellulaire de sérines/thréonines kinases telles que les PKC et/ou les CDK. L'augmentation de l'activité et/ou de l'expression des PKC et CDK mènerait alors à l'augmentation de la phosphorylation de DNMT1 (2) qui affecterait de plusieurs façons l'enzyme, ayant différentes conséquences sur le niveau de méthylation de l'ADN. Dans le cas de la dérégulation de la voie des PKC (3a), la phosphorylation de DNMT1 causerait une réduction globale du niveau de méthylation de l'ADN, affectant possiblement les régions répétitives du génome et certains oncogènes. Au contraire, s'il y avait dérégulation des CDK (3b), la phosphorylation de DNMT1 conduirait plutôt à l'augmentation du niveau de méthylation de certaines régions du génome (hyperméthylation), touchant possiblement des gènes suppresseurs de tumeurs. La dérégulation des PKC et/ou des CDK pourrait donc faire partie intégrante des processus d'initiation et de progression du cancer (4), par leur rôle dans la régulation de la DNMT1 par la phosphorylation et donc, par leur implication dans la régulation de la méthylation de l'ADN. Les inhibiteurs de sérine/thréonine kinases (5), telles que les PKC et les CDK, pourraient ainsi être utilisés, seuls ou en combinaisons avec des agents anticancéreux comme la 5-aza-dC, dans le traitement du cancer.

## 7. Conclusion générale

La régulation de DNMT1 est un processus complexe puisqu'il aborde plusieurs aspects différents, tels que la régulation allostérique, transcriptionnelle et post-transcriptionnelle ainsi que post-traductionnelle. Dans la présente thèse, l'importance de la phosphorylation de DNMT1 par les PKC et les CDK a été mise en évidence. Le fait que la surexpression de DNMT1 et de PKC $\zeta$  dans la cellule mène à l'hypométhylation du génome reflète l'importance de notre étude. Nos résultats, en plus de démontrer que la phosphorylation de DNMT1 par les PKC est spécifique à certains isoformes, supportent les résultats obtenus par Hervouet *et al.* [358] démontrant l'implication de la phosphorylation de DNMT1 par les PKC dans le cancer. Par ailleurs, nos résultats montrent l'importance de la Ser154 dans l'activité et la stabilité de DNMT1, et suggèrent un rôle majeur dans le contrôle de la méthylation de l'ADN. En plus de sa conservation à travers l'évolution et de sa haute accessibilité dans la structure prédictive de la protéine, le fait que la Ser154 soit phosphorylée par les CDK1, 2 et 5 lui suggère un rôle dans la régulation de l'activité de DNMT1 à travers le cycle cellulaire.

Le contrôle de DNMT1 par la phosphorylation par les sérine/thréonine kinases est encore très peu étudié et les résultats de cette thèse ont permis d'en connaître davantage sur la nature des kinases, de même que sur les effets de cette phosphorylation sur la méthylation de l'ADN. Étant donné l'importance de l'hypométhylation et l'hyperméthylation de l'ADN dans le développement des cancers, l'implication de kinases telles que les PKC et les CDK dans le processus de méthylation de l'ADN devient alors une avenue thérapeutique intéressante. L'amélioration des traitements anti-cancers pourrait se faire, par exemple, en combinant des inhibiteurs spécifiques de PKC et/ou de CDK aux agents déméthylants déjà utilisés dans le traitement du cancer. Il serait alors possible de contrer la résistance acquise par les cellules cancéreuses face à ces médicaments et de diminuer leur forte toxicité cellulaire, pour ainsi augmenter l'efficacité des traitements.

## **RÉFÉRENCES**

1. Smith, L.T., G.A. Otterson, and C. Plass, *Unraveling the epigenetic code of cancer for therapy*. Trends Genet, 2007. **23**(9): p. 449-56.
2. Waddington, C.H., ed. *The strategy of the genes*. 1957, London: Georges Allen and Unwin.
3. Strahl, B.D. and C.D. Allis, *The language of covalent histone modifications*. Nature, 2000. **403**(6765): p. 41-5.
4. Turner, B.M., *Histone acetylation and an epigenetic code*. Bioessays, 2000. **22**(9): p. 836-45.
5. Jenuwein, T. and C.D. Allis, *Translating the histone code*. Science, 2001. **293**(5532): p. 1074-80.
6. Allis, C.A., T. Jenuwein, D. Reinberg, and M.-L. Caporos, eds. *Epigenetics*. 2007, Cold Spring Harbor Laboratory Press. 502 pp.
7. Kornberg, R.D., *Chromatin structure: a repeating unit of histones and DNA*. Science, 1974. **184**(139): p. 868-71.
8. Sparmann, A. and M. van Lohuizen, *Polycomb silencers control cell fate, development and cancer*. Nat Rev Cancer, 2006. **6**(11): p. 846-56.
9. Sims, R.J., 3rd, S.S. Mandal, and D. Reinberg, *Recent highlights of RNA-polymerase-II-mediated transcription*. Curr Opin Cell Biol, 2004. **16**(3): p. 263-71.
10. Mito, Y., J.G. Henikoff, and S. Henikoff, *Genome-scale profiling of histone H3.3 replacement patterns*. Nat Genet, 2005. **37**(10): p. 1090-7.
11. Sekinger, E.A., Z. Moqtaderi, and K. Struhl, *Intrinsic histone-DNA interactions and low nucleosome density are important for preferential accessibility of promoter regions in yeast*. Mol Cell, 2005. **18**(6): p. 735-48.
12. Schueler, M.G. and B.A. Sullivan, *Structural and functional dynamics of human centromeric chromatin*. Annu Rev Genomics Hum Genet, 2006. **7**: p. 301-13.
13. Karpen, G.H. and R.C. Allshire, *The case for epigenetic effects on centromere identity and function*. Trends Genet, 1997. **13**(12): p. 489-96.
14. Henikoff, S., *Position-effect variegation after 60 years*. Trends Genet, 1990. **6**(12): p. 422-6.
15. Tollefsbol, T., ed. *Handbook of Epigenetics. The New Molecular and Medical Genetics*. Elsevier Inc. ed. 2010.
16. Luger, K., A.W. Mader, R.K. Richmond, D.F. Sargent, and T.J. Richmond, *Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution*. Nature, 1997. **389**(6648): p. 251-60.
17. Th'ng, J.P., R. Sung, M. Ye, and M.J. Hendzel, *H1 family histones in the nucleus. Control of binding and localization by the C-terminal domain*. J Biol Chem, 2005. **280**(30): p. 27809-14.
18. Allfrey, V.G., R. Faulkner, and A.E. Mirsky, *Acetylation and Methylation of Histones and Their Possible Role in the Regulation of RNA Synthesis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1964. **51**: p. 786-94.
19. Vaquero, A., A. Loyola, and D. Reinberg, *The constantly changing face of chromatin*. Sci Aging Knowledge Environ, 2003. **2003**(14): p. RE4.
20. Cheung, P., C.D. Allis, and P. Sassone-Corsi, *Signaling to chromatin through histone modifications*. Cell, 2000. **103**(2): p. 263-71.
21. Turner, B.M., *Cellular memory and the histone code*. Cell, 2002. **111**(3): p. 285-91.

22. Zhang, Y. and D. Reinberg, *Transcription regulation by histone methylation: interplay between different covalent modifications of the core histone tails*. Genes Dev, 2001. **15**(18): p. 2343-60.
23. Jaenisch, R. and A. Bird, *Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals*. Nat Genet, 2003. **33 Suppl**: p. 245-54.
24. Biel, M., V. Wascholowski, and A. Giannis, *Epigenetics--an epicenter of gene regulation: histones and histone-modifying enzymes*. Angew Chem Int Ed Engl, 2005. **44**(21): p. 3186-216.
25. Smith, E.R., J.M. Belote, R.L. Schiltz, X.J. Yang, P.A. Moore, S.L. Berger, Y. Nakatani, and C.D. Allis, *Cloning of Drosophila GCN5: conserved features among metazoan GCN5 family members*. Nucleic Acids Res, 1998. **26**(12): p. 2948-54.
26. Xu, W., D.G. Edmondson, and S.Y. Roth, *Mammalian GCN5 and P/CAF acetyltransferases have homologous amino-terminal domains important for recognition of nucleosomal substrates*. Mol Cell Biol, 1998. **18**(10): p. 5659-69.
27. Yang, X.J., V.V. Ogryzko, J. Nishikawa, B.H. Howard, and Y. Nakatani, *A p300/CBP-associated factor that competes with the adenoviral oncoprotein E1A*. Nature, 1996. **382**(6589): p. 319-24.
28. Kawasaki, H., L. Schiltz, R. Chiu, K. Itakura, K. Taira, Y. Nakatani, and K.K. Yokoyama, *ATF-2 has intrinsic histone acetyltransferase activity which is modulated by phosphorylation*. Nature, 2000. **405**(6783): p. 195-200.
29. Champagne, N., N. Pelletier, and X.J. Yang, *The monocytic leukemia zinc finger protein MOZ is a histone acetyltransferase*. Oncogene, 2001. **20**(3): p. 404-9.
30. Yamamoto, T. and M. Horikoshi, *Novel substrate specificity of the histone acetyltransferase activity of HIV-1-Tat interactive protein Tip60*. J Biol Chem, 1997. **272**(49): p. 30595-8.
31. Ogryzko, V.V., R.L. Schiltz, V. Russanova, B.H. Howard, and Y. Nakatani, *The transcriptional coactivators p300 and CBP are histone acetyltransferases*. Cell, 1996. **87**(5): p. 953-9.
32. Bannister, A.J. and T. Kouzarides, *The CBP co-activator is a histone acetyltransferase*. Nature, 1996. **384**(6610): p. 641-3.
33. Schotta, G., A. Ebert, V. Krauss, A. Fischer, J. Hoffmann, S. Rea, T. Jenuwein, R. Dorn, and G. Reuter, *Central role of Drosophila SU(VAR)3-9 in histone H3-K9 methylation and heterochromatic gene silencing*. EMBO J, 2002. **21**(5): p. 1121-31.
34. Xiao, B., C. Jing, J.R. Wilson, P.A. Walker, N. Vasisht, G. Kelly, S. Howell, I.A. Taylor, G.M. Blackburn, and S.J. Gamblin, *Structure and catalytic mechanism of the human histone methyltransferase SET7/9*. Nature, 2003. **421**(6923): p. 652-6.
35. Wang, H., R. Cao, L. Xia, H. Erdjument-Bromage, C. Borchers, P. Tempst, and Y. Zhang, *Purification and functional characterization of a histone H3-lysine 4-specific methyltransferase*. Mol Cell, 2001. **8**(6): p. 1207-17.
36. Tachibana, M., K. Sugimoto, T. Fukushima, and Y. Shinkai, *Set domain-containing protein, G9a, is a novel lysine-preferring mammalian histone methyltransferase with hyperactivity and specific selectivity to lysines 9 and 27 of histone H3*. J Biol Chem, 2001. **276**(27): p. 25309-17.
37. Rice, J.C., S.D. Briggs, B. Ueberheide, C.M. Barber, J. Shabanowitz, D.F. Hunt, Y. Shinkai, and C.D. Allis, *Histone methyltransferases direct different degrees of methylation to define distinct chromatin domains*. Mol Cell, 2003. **12**(6): p. 1591-8.

38. Cao, R., L. Wang, H. Wang, L. Xia, H. Erdjument-Bromage, P. Tempst, R.S. Jones, and Y. Zhang, *Role of histone H3 lysine 27 methylation in Polycomb-group silencing*. Science, 2002. **298**(5595): p. 1039-43.
39. Tang, J., A. Frankel, R.J. Cook, S. Kim, W.K. Paik, K.R. Williams, S. Clarke, and H.R. Herschman, *PRMT1 is the predominant type I protein arginine methyltransferase in mammalian cells*. J Biol Chem, 2000. **275**(11): p. 7723-30.
40. Chen, D., H. Ma, H. Hong, S.S. Koh, S.M. Huang, B.T. Schurter, D.W. Aswad, and M.R. Stallcup, *Regulation of transcription by a protein methyltransferase*. Science, 1999. **284**(5423): p. 2174-7.
41. Ma, H., C.T. Baumann, H. Li, B.D. Strahl, R. Rice, M.A. Jelinek, D.W. Aswad, C.D. Allis, G.L. Hager, and M.R. Stallcup, *Hormone-dependent, CARM1-directed, arginine-specific methylation of histone H3 on a steroid-regulated promoter*. Curr Biol, 2001. **11**(24): p. 1981-5.
42. Branscombe, T.L., A. Frankel, J.H. Lee, J.R. Cook, Z. Yang, S. Pestka, and S. Clarke, *PRMT5 (Janus kinase-binding protein 1) catalyzes the formation of symmetric dimethylarginine residues in proteins*. J Biol Chem, 2001. **276**(35): p. 32971-6.
43. Rho, J., S. Choi, Y.R. Seong, W.K. Cho, S.H. Kim, and D.S. Im, *Prmt5, which forms distinct homo-oligomers, is a member of the protein-arginine methyltransferase family*. J Biol Chem, 2001. **276**(14): p. 11393-401.
44. Crosio, C., G.M. Fimia, R. Loury, M. Kimura, Y. Okano, H. Zhou, S. Sen, C.D. Allis, and P. Sassone-Corsi, *Mitotic phosphorylation of histone H3: spatio-temporal regulation by mammalian Aurora kinases*. Mol Cell Biol, 2002. **22**(3): p. 874-85.
45. Goto, H., Y. Yasui, E.A. Nigg, and M. Inagaki, *Aurora-B phosphorylates Histone H3 at serine28 with regard to the mitotic chromosome condensation*. Genes Cells, 2002. **7**(1): p. 11-7.
46. Kyriakis, J.M. and J. Avruch, *Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation*. Physiol Rev, 2001. **81**(2): p. 807-69.
47. Crosio, C., N. Cermakian, C.D. Allis, and P. Sassone-Corsi, *Light induces chromatin modification in cells of the mammalian circadian clock*. Nat Neurosci, 2000. **3**(12): p. 1241-7.
48. Salvador, L.M., Y. Park, J. Cottom, E.T. Maizels, J.C. Jones, R.V. Schillace, D.W. Carr, P. Cheung, C.D. Allis, J.L. Jameson, and M. Hunzicker-Dunn, *Follicle-stimulating hormone stimulates protein kinase A-mediated histone H3 phosphorylation and acetylation leading to select gene activation in ovarian granulosa cells*. J Biol Chem, 2001. **276**(43): p. 40146-55.
49. Krogan, N.J., J. Dover, A. Wood, J. Schneider, J. Heidt, M.A. Boateng, K. Dean, O.W. Ryan, A. Golshani, M. Johnston, J.F. Greenblatt, and A. Shilatifard, *The Paf1 complex is required for histone H3 methylation by COMPASS and Dot1p: linking transcriptional elongation to histone methylation*. Mol Cell, 2003. **11**(3): p. 721-9.
50. Shiio, Y. and R.N. Eisenman, *Histone sumoylation is associated with transcriptional repression*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(23): p. 13225-30.
51. Huletsky, A., G. de Murcia, S. Muller, M. Hengartner, L. Menard, D. Lamarre, and G.G. Poirier, *The effect of poly(ADP-ribosyl)ation on native and H1-depleted chromatin. A role of poly(ADP-ribosyl)ation on core nucleosome structure*. J Biol Chem, 1989. **264**(15): p. 8878-86.

52. Tulin, A. and A. Spradling, *Chromatin loosening by poly(ADP)-ribose polymerase (PARP) at Drosophila puff loci*. Science, 2003. **299**(5606): p. 560-2.
53. Tulin, A., D. Stewart, and A.C. Spradling, *The Drosophila heterochromatic gene encoding poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) is required to modulate chromatin structure during development*. Genes Dev, 2002. **16**(16): p. 2108-19.
54. Dhalluin, C., J.E. Carlson, L. Zeng, C. He, A.K. Aggarwal, and M.M. Zhou, *Structure and ligand of a histone acetyltransferase bromodomain*. Nature, 1999. **399**(6735): p. 491-6.
55. Jacobson, R.H., A.G. Ladurner, D.S. King, and R. Tjian, *Structure and function of a human TAFII250 double bromodomain module*. Science, 2000. **288**(5470): p. 1422-5.
56. Narlikar, G.J., H.Y. Fan, and R.E. Kingston, *Cooperation between complexes that regulate chromatin structure and transcription*. Cell, 2002. **108**(4): p. 475-87.
57. Field, L.M., F. Lyko, M. Mandrioli, and G. Prantera, *DNA methylation in insects*. Insect Mol Biol, 2004. **13**(2): p. 109-15.
58. Mandrioli, M., *Epigenetic tinkering and evolution: is there any continuity in the role of cytosine methylation from invertebrates to vertebrates?* Cell Mol Life Sci, 2004. **61**(19-20): p. 2425-7.
59. Fuso, A., G. Ferraguti, F. Grandoni, R. Ruggeri, S. Scarpa, R. Strom, and M. Lucarelli, *Early demethylation of non-CpG, CpC-rich, elements in the myogenin 5'-flanking region: a priming effect on the spreading of active demethylation*. Cell Cycle, 2010. **9**(19): p. 3965-76.
60. Lister, R., M. Pelizzola, R.H. Dowen, R.D. Hawkins, G. Hon, J. Tonti-Filippini, J.R. Nery, L. Lee, Z. Ye, Q.M. Ngo, L. Edsall, J. Antosiewicz-Bourget, R. Stewart, V. Ruotti, A.H. Millar, J.A. Thomson, B. Ren, and J.R. Ecker, *Human DNA methylomes at base resolution show widespread epigenomic differences*. Nature, 2009. **462**(7271): p. 315-22.
61. Herman, J.G. and S.B. Baylin, *Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation*. N Engl J Med, 2003. **349**(21): p. 2042-54.
62. Ehrlich, M., M.A. Gama-Sosa, L.H. Huang, R.M. Midgett, K.C. Kuo, R.A. McCune, and C. Gehrke, *Amount and distribution of 5-methylcytosine in human DNA from different types of tissues of cells*. Nucleic Acids Res, 1982. **10**(8): p. 2709-21.
63. Bird, A., *DNA methylation patterns and epigenetic memory*. Genes Dev, 2002. **16**(1): p. 6-21.
64. Rakyan, V.K., T. Hildmann, K.L. Novik, J. Lewin, J. Tost, A.V. Cox, T.D. Andrews, K.L. Howe, T. Otto, A. Olek, J. Fischer, I.G. Gut, K. Berlin, and S. Beck, *DNA methylation profiling of the human major histocompatibility complex: a pilot study for the human epigenome project*. PLoS Biol, 2004. **2**(12): p. e405.
65. Eckhardt, F., J. Lewin, R. Cortese, V.K. Rakyan, J. Attwood, M. Burger, J. Burton, T.V. Cox, R. Davies, T.A. Down, C. Haefliger, R. Horton, K. Howe, D.K. Jackson, J. Kunde, C. Koenig, J. Liddle, D. Niblett, T. Otto, R. Pettett, S. Seemann, C. Thompson, T. West, J. Rogers, A. Olek, K. Berlin, and S. Beck, *DNA methylation profiling of human chromosomes 6, 20 and 22*. Nat Genet, 2006. **38**(12): p. 1378-85.
66. Suzuki, M.M. and A. Bird, *DNA methylation landscapes: provocative insights from epigenomics*. Nat Rev Genet, 2008. **9**(6): p. 465-76.
67. Antequera, F. and A. Bird, *Number of CpG islands and genes in human and mouse*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(24): p. 11995-9.
68. Cross, S.H. and A.P. Bird, *CpG islands and genes*. Curr Opin Genet Dev, 1995. **5**(3): p. 309-14.

69. Tazi, J. and A. Bird, *Alternative chromatin structure at CpG islands*. Cell, 1990. **60**(6): p. 909-20.
70. Baylin, S.B., *Tying it all together: epigenetics, genetics, cell cycle, and cancer*. Science, 1997. **277**(5334): p. 1948-9.
71. Goll, M.G. and T.H. Bestor, *Eukaryotic cytosine methyltransferases*. Annu Rev Biochem, 2005. **74**: p. 481-514.
72. Gardiner-Garden, M. and M. Frommer, *CpG islands in vertebrate genomes*. J Mol Biol, 1987. **196**(2): p. 261-82.
73. Callinan, P.A. and A.P. Feinberg, *The emerging science of epigenomics*. Hum Mol Genet, 2006. **15 Spec No 1**: p. R95-101.
74. Takai, D. and P.A. Jones, *Comprehensive analysis of CpG islands in human chromosomes 21 and 22*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(6): p. 3740-5.
75. Bestor, T., A. Laudano, R. Mattaliano, and V. Ingram, *Cloning and sequencing of a cDNA encoding DNA methyltransferase of mouse cells. The carboxyl-terminal domain of the mammalian enzymes is related to bacterial restriction methyltransferases*. J Mol Biol, 1988. **203**(4): p. 971-83.
76. Bestor, T.H., *The DNA methyltransferases of mammals*. Hum Mol Genet, 2000. **9**(16): p. 2395-402.
77. Goll, M.G., F. Kirpekar, K.A. Maggert, J.A. Yoder, C.L. Hsieh, X. Zhang, K.G. Golic, S.E. Jacobsen, and T.H. Bestor, *Methylation of tRNAAsp by the DNA methyltransferase homolog Dnmt2*. Science, 2006. **311**(5759): p. 395-8.
78. Jurkowski, T.P., M. Meusburger, S. Phalke, M. Helm, W. Nellen, G. Reuter, and A. Jeltsch, *Human DNMT2 methylates tRNA(Asp) molecules using a DNA methyltransferase-like catalytic mechanism*. RNA, 2008. **14**(8): p. 1663-70.
79. Schaefer, M., T. Pollex, K. Hanna, F. Tuorto, M. Meusburger, M. Helm, and F. Lyko, *RNA methylation by Dnmt2 protects transfer RNAs against stress-induced cleavage*. Genes Dev, 2010. **24**(15): p. 1590-5.
80. Thiagarajan, D., R.R. Dev, and S. Khosla, *The DNA methyltransferase Dnmt2 participates in RNA processing during cellular stress*. Epigenetics, 2011. **6**(1): p. 103-13.
81. Chedin, F., M.R. Lieber, and C.L. Hsieh, *The DNA methyltransferase-like protein DNMT3L stimulates de novo methylation by Dnmt3a*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(26): p. 16916-21.
82. Chen, Z.X., J.R. Mann, C.L. Hsieh, A.D. Riggs, and F. Chedin, *Physical and functional interactions between the human DNMT3L protein and members of the de novo methyltransferase family*. J Cell Biochem, 2005. **95**(5): p. 902-17.
83. Pradhan, S., A. Bacolla, R.D. Wells, and R.J. Roberts, *Recombinant human DNA (cytosine-5) methyltransferase. I. Expression, purification, and comparison of de novo and maintenance methylation*. J Biol Chem, 1999. **274**(46): p. 33002-10.
84. Okano, M., D.W. Bell, D.A. Haber, and E. Li, *DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development*. Cell, 1999. **99**(3): p. 247-57.
85. El-Osta, A., *DNMT cooperativity—the developing links between methylation, chromatin structure and cancer*. Bioessays, 2003. **25**(11): p. 1071-84.
86. Li, E., T.H. Bestor, and R. Jaenisch, *Targeted mutation of the DNA methyltransferase gene results in embryonic lethality*. Cell, 1992. **69**(6): p. 915-26.

87. Howell, C.Y., T.H. Bestor, F. Ding, K.E. Latham, C. Mertineit, J.M. Trasler, and J.R. Chaillet, *Genomic imprinting disrupted by a maternal effect mutation in the Dnmt1 gene*. Cell, 2001. **104**(6): p. 829-38.
88. Okano, M., S. Xie, and E. Li, *Dnmt2 is not required for de novo and maintenance methylation of viral DNA in embryonic stem cells*. Nucleic Acids Res, 1998. **26**(11): p. 2536-40.
89. Bourc'his, D., G.L. Xu, C.S. Lin, B. Bollman, and T.H. Bestor, *Dnmt3L and the establishment of maternal genomic imprints*. Science, 2001. **294**(5551): p. 2536-9.
90. Hata, K., M. Okano, H. Lei, and E. Li, *Dnmt3L cooperates with the Dnmt3 family of de novo DNA methyltransferases to establish maternal imprints in mice*. Development, 2002. **129**(8): p. 1983-93.
91. Turek-Plewa, J. and P.P. Jagodzinski, *The role of mammalian DNA methyltransferases in the regulation of gene expression*. Cell Mol Biol Lett, 2005. **10**(4): p. 631-47.
92. Hermann, A., H. Gowher, and A. Jeltsch, *Biochemistry and biology of mammalian DNA methyltransferases*. Cell Mol Life Sci, 2004. **61**(19-20): p. 2571-87.
93. Xie, S., Z. Wang, M. Okano, M. Nogami, Y. Li, W.W. He, K. Okumura, and E. Li, *Cloning, expression and chromosome locations of the human DNMT3 gene family*. Gene, 1999. **236**(1): p. 87-95.
94. Fuks, F., W.A. Burgers, N. Godin, M. Kasai, and T. Kouzarides, *Dnmt3a binds deacetylases and is recruited by a sequence-specific repressor to silence transcription*. EMBO J, 2001. **20**(10): p. 2536-44.
95. Di Croce, L., V.A. Raker, M. Corsaro, F. Fazi, M. Fanelli, M. Faretta, F. Fuks, F. Lo Coco, T. Kouzarides, C. Nervi, S. Minucci, and P.G. Pelicci, *Methyltransferase recruitment and DNA hypermethylation of target promoters by an oncogenic transcription factor*. Science, 2002. **295**(5557): p. 1079-82.
96. Fuks, F., P.J. Hurd, R. Deplus, and T. Kouzarides, *The DNA methyltransferases associate with HP1 and the SUV39H1 histone methyltransferase*. Nucleic Acids Res, 2003. **31**(9): p. 2305-12.
97. Geiman, T.M., U.T. Sankpal, A.K. Robertson, Y. Chen, M. Mazumdar, J.T. Heale, J.A. Schmiesing, W. Kim, K. Yokomori, Y. Zhao, and K.D. Robertson, *Isolation and characterization of a novel DNA methyltransferase complex linking DNMT3B with components of the mitotic chromosome condensation machinery*. Nucleic Acids Res, 2004. **32**(9): p. 2716-29.
98. Kang, E.S., C.W. Park, and J.H. Chung, *Dnmt3b, de novo DNA methyltransferase, interacts with SUMO-1 and Ubc9 through its N-terminal region and is subject to modification by SUMO-1*. Biochem Biophys Res Commun, 2001. **289**(4): p. 862-8.
99. Kim, G.D., J. Ni, N. Kelesoglu, R.J. Roberts, and S. Pradhan, *Co-operation and communication between the human maintenance and de novo DNA (cytosine-5) methyltransferases*. EMBO J, 2002. **21**(15): p. 4183-95.
100. Bachman, K.E., M.R. Rountree, and S.B. Baylin, *Dnmt3a and Dnmt3b are transcriptional repressors that exhibit unique localization properties to heterochromatin*. J Biol Chem, 2001. **276**(34): p. 32282-7.
101. Margot, J.B., A.E. Ehrenhofer-Murray, and H. Leonhardt, *Interactions within the mammalian DNA methyltransferase family*. BMC Mol Biol, 2003. **4**: p. 7.
102. Jones, P.A. and S.B. Baylin, *The fundamental role of epigenetic events in cancer*. Nat Rev Genet, 2002. **3**(6): p. 415-28.

103. Feinberg, A.P., R. Ohlsson, and S. Henikoff, *The epigenetic progenitor origin of human cancer*. Nat Rev Genet, 2006. **7**(1): p. 21-33.
104. Herceg, Z., *Epigenetics and cancer: towards an evaluation of the impact of environmental and dietary factors*. Mutagenesis, 2007. **22**(2): p. 91-103.
105. Feinberg, A.P. and B. Tycko, *The history of cancer epigenetics*. Nat Rev Cancer, 2004. **4**(2): p. 143-53.
106. Watt, F. and P.L. Molloy, *Cytosine methylation prevents binding to DNA of a HeLa cell transcription factor required for optimal expression of the adenovirus major late promoter*. Genes Dev, 1988. **2**(9): p. 1136-43.
107. Singal, R. and G.D. Ginder, *DNA methylation*. Blood, 1999. **93**(12): p. 4059-70.
108. Santos-Reboucas, C.B. and M.M. Pimentel, *Implication of abnormal epigenetic patterns for human diseases*. Eur J Hum Genet, 2007. **15**(1): p. 10-7.
109. Nan, X., H.H. Ng, C.A. Johnson, C.D. Laherty, B.M. Turner, R.N. Eisenman, and A. Bird, *Transcriptional repression by the methyl-CpG-binding protein MeCP2 involves a histone deacetylase complex*. Nature, 1998. **393**(6683): p. 386-9.
110. Nan, X., F.J. Campoy, and A. Bird, *MeCP2 is a transcriptional repressor with abundant binding sites in genomic chromatin*. Cell, 1997. **88**(4): p. 471-81.
111. Meehan, R.R., J.D. Lewis, S. McKay, E.L. Kleiner, and A.P. Bird, *Identification of a mammalian protein that binds specifically to DNA containing methylated CpGs*. Cell, 1989. **58**(3): p. 499-507.
112. Lewis, J.D., R.R. Meehan, W.J. Henzel, I. Maurer-Fogy, P. Jeppesen, F. Klein, and A. Bird, *Purification, sequence, and cellular localization of a novel chromosomal protein that binds to methylated DNA*. Cell, 1992. **69**(6): p. 905-14.
113. Hendrich, B. and S. Tweedie, *The methyl-CpG binding domain and the evolving role of DNA methylation in animals*. Trends Genet, 2003. **19**(5): p. 269-77.
114. Prokhortchouk, A., B. Hendrich, H. Jorgensen, A. Ruzov, M. Wilm, G. Georgiev, A. Bird, and E. Prokhortchouk, *The p120 catenin partner Kaiso is a DNA methylation-dependent transcriptional repressor*. Genes Dev, 2001. **15**(13): p. 1613-8.
115. Yoon, H.G., D.W. Chan, A.B. Reynolds, J. Qin, and J. Wong, *N-CoR mediates DNA methylation-dependent repression through a methyl CpG binding protein Kaiso*. Mol Cell, 2003. **12**(3): p. 723-34.
116. Jones, P.L., G.J. Veenstra, P.A. Wade, D. Vermaak, S.U. Kass, N. Landsberger, J. Strouboulis, and A.P. Wolffe, *Methylated DNA and MeCP2 recruit histone deacetylase to repress transcription*. Nat Genet, 1998. **19**(2): p. 187-91.
117. Ng, H.H., Y. Zhang, B. Hendrich, C.A. Johnson, B.M. Turner, H. Erdjument-Bromage, P. Tempst, D. Reinberg, and A. Bird, *MBD2 is a transcriptional repressor belonging to the MeCP1 histone deacetylase complex*. Nat Genet, 1999. **23**(1): p. 58-61.
118. Sarraf, S.A. and I. Stancheva, *Methyl-CpG binding protein MBD1 couples histone H3 methylation at lysine 9 by SETDB1 to DNA replication and chromatin assembly*. Mol Cell, 2004. **15**(4): p. 595-605.
119. Wade, P.A., A. Gegonne, P.L. Jones, E. Ballestar, F. Aubry, and A.P. Wolffe, *Mi-2 complex couples DNA methylation to chromatin remodelling and histone deacetylation*. Nat Genet, 1999. **23**(1): p. 62-6.
120. Zhang, Y., H.H. Ng, H. Erdjument-Bromage, P. Tempst, A. Bird, and D. Reinberg, *Analysis of the NuRD subunits reveals a histone deacetylase core complex and a connection with DNA methylation*. Genes Dev, 1999. **13**(15): p. 1924-35.

121. Feng, Q. and Y. Zhang, *The MeCP1 complex represses transcription through preferential binding, remodeling, and deacetylating methylated nucleosomes*. Genes Dev, 2001. **15**(7): p. 827-32.
122. Klose, R.J. and A.P. Bird, *MeCP2 behaves as an elongated monomer that does not stably associate with the Sin3a chromatin remodeling complex*. J Biol Chem, 2004. **279**(45): p. 46490-6.
123. Kondo, E., Z. Gu, A. Horii, and S. Fukushige, *The thymine DNA glycosylase MBD4 represses transcription and is associated with methylated p16(INK4a) and hMLH1 genes*. Mol Cell Biol, 2005. **25**(11): p. 4388-96.
124. Sharif, J., M. Muto, S. Takebayashi, I. Suetake, A. Iwamatsu, T.A. Endo, J. Shinga, Y. Mizutani-Koseki, T. Toyoda, K. Okamura, S. Tajima, K. Mitsuya, M. Okano, and H. Koseki, *The SRA protein Np95 mediates epigenetic inheritance by recruiting Dnmt1 to methylated DNA*. Nature, 2007. **450**(7171): p. 908-12.
125. Bostick, M., J.K. Kim, P.O. Esteve, A. Clark, S. Pradhan, and S.E. Jacobsen, *UHRF1 plays a role in maintaining DNA methylation in mammalian cells*. Science, 2007. **317**(5845): p. 1760-4.
126. Hashimoto, H., J.R. Horton, X. Zhang, M. Bostick, S.E. Jacobsen, and X. Cheng, *The SRA domain of UHRF1 flips 5-methylcytosine out of the DNA helix*. Nature, 2008. **455**(7214): p. 826-9.
127. Vaissiere, T., C. Sawan, and Z. Herceg, *Epigenetic interplay between histone modifications and DNA methylation in gene silencing*. Mutat Res, 2008. **659**(1-2): p. 40-8.
128. Weber, M., I. Hellmann, M.B. Stadler, L. Ramos, S. Paabo, M. Rebhan, and D. Schubeler, *Distribution, silencing potential and evolutionary impact of promoter DNA methylation in the human genome*. Nat Genet, 2007. **39**(4): p. 457-66.
129. De Smet, C., C. Lurquin, B. Lethe, V. Martelange, and T. Boon, *DNA methylation is the primary silencing mechanism for a set of germ line- and tumor-specific genes with a CpG-rich promoter*. Mol Cell Biol, 1999. **19**(11): p. 7327-35.
130. Stein, R., A. Razin, and H. Cedar, *In vitro methylation of the hamster adenine phosphoribosyltransferase gene inhibits its expression in mouse L cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1982. **79**(11): p. 3418-22.
131. Futscher, B.W., M.M. Oshiro, R.J. Wozniak, N. Holtan, C.L. Hanigan, H. Duan, and F.E. Domann, *Role for DNA methylation in the control of cell type specific maspin expression*. Nat Genet, 2002. **31**(2): p. 175-9.
132. Song, F., J.F. Smith, M.T. Kimura, A.D. Morrow, T. Matsuyama, H. Nagase, and W.A. Held, *Association of tissue-specific differentially methylated regions (TDMs) with differential gene expression*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(9): p. 3336-41.
133. Illingworth, R., A. Kerr, D. Desousa, H. Jorgensen, P. Ellis, J. Stalker, D. Jackson, C. Clee, R. Plumb, J. Rogers, S. Humphray, T. Cox, C. Langford, and A. Bird, *A novel CpG island set identifies tissue-specific methylation at developmental gene loci*. PLoS Biol, 2008. **6**(1): p. e22.
134. Rauch, T.A., X. Wu, X. Zhong, A.D. Riggs, and G.P. Pfeifer, *A human B cell methylome at 100-base pair resolution*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(3): p. 671-8.
135. Oakes, C.C., S. La Salle, D.J. Smiraglia, B. Robaire, and J.M. Trasler, *A unique configuration of genome-wide DNA methylation patterns in the testis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(1): p. 228-33.
136. Reik, W., W. Dean, and J. Walter, *Epigenetic reprogramming in mammalian development*. Science, 2001. **293**(5532): p. 1089-93.

137. Rideout, W.M., 3rd, K. Eggan, and R. Jaenisch, *Nuclear cloning and epigenetic reprogramming of the genome*. Science, 2001. **293**(5532): p. 1093-8.
138. Surani, M.A., *Reprogramming of genome function through epigenetic inheritance*. Nature, 2001. **414**(6859): p. 122-8.
139. Lyle, R., *Gametic imprinting in development and disease*. J Endocrinol, 1997. **155**(1): p. 1-12.
140. Miozzo, M. and G. Simoni, *The role of imprinted genes in fetal growth*. Biol Neonate, 2002. **81**(4): p. 217-28.
141. Stoger, R., P. Kubicka, C.G. Liu, T. Kafri, A. Razin, H. Cedar, and D.P. Barlow, *Maternal-specific methylation of the imprinted mouse Igf2r locus identifies the expressed locus as carrying the imprinting signal*. Cell, 1993. **73**(1): p. 61-71.
142. Bartolomei, M.S., A.L. Webber, M.E. Brunkow, and S.M. Tilghman, *Epigenetic mechanisms underlying the imprinting of the mouse H19 gene*. Genes Dev, 1993. **7**(9): p. 1663-73.
143. Feil, R., J. Walter, N.D. Allen, and W. Reik, *Developmental control of allelic methylation in the imprinted mouse Igf2 and H19 genes*. Development, 1994. **120**(10): p. 2933-43.
144. Hsieh, C.L. and M.R. Lieber, *CpG methylated minichromosomes become inaccessible for V(D)J recombination after undergoing replication*. EMBO J, 1992. **11**(1): p. 315-25.
145. Cherry, S.R. and D. Baltimore, *Chromatin remodeling directly activates V(D)J recombination*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(19): p. 10788-93.
146. Kazazian, H.H., Jr., *Mobile elements: drivers of genome evolution*. Science, 2004. **303**(5664): p. 1626-32.
147. Robertson, H.M. and K.L. Zumpano, *Molecular evolution of an ancient mariner transposon, Hsmar1, in the human genome*. Gene, 1997. **205**(1-2): p. 203-17.
148. Rodenhiser, D. and M. Mann, *Epigenetics and human disease: translating basic biology into clinical applications*. CMAJ, 2006. **174**(3): p. 341-8.
149. Hansen, R.S., C. Wijmenga, P. Luo, A.M. Stanek, T.K. Canfield, C.M. Weemaes, and S.M. Gartler, *The DNMT3B DNA methyltransferase gene is mutated in the ICF immunodeficiency syndrome*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(25): p. 14412-7.
150. Maraschio, P., R. Tupler, E. Dainotti, M. Piantanida, G. Cazzola, and L. Tiepolo, *Differential expression of the ICF (immunodeficiency, centromeric heterochromatin, facial anomalies) mutation in lymphocytes and fibroblasts*. J Med Genet, 1989. **26**(7): p. 452-6.
151. Hagberg, B., J. Aicardi, K. Dias, and O. Ramos, *A progressive syndrome of autism, dementia, ataxia, and loss of purposeful hand use in girls: Rett's syndrome: report of 35 cases*. Ann Neurol, 1983. **14**(4): p. 471-9.
152. Schollen, E., E. Smeets, E. Deflem, J.P. Fryns, and G. Matthijs, *Gross rearrangements in the MECP2 gene in three patients with Rett syndrome: implications for routine diagnosis of Rett syndrome*. Hum Mutat, 2003. **22**(2): p. 116-20.
153. Herman, J.G., F. Latif, Y. Weng, M.I. Lerman, B. Zbar, S. Liu, D. Samid, D.S. Duan, J.R. Gnarr, W.M. Linehan, and et al., *Silencing of the VHL tumor-suppressor gene by DNA methylation in renal carcinoma*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(21): p. 9700-4.
154. Coulondre, C., J.H. Miller, P.J. Farabaugh, and W. Gilbert, *Molecular basis of base substitution hotspots in Escherichia coli*. Nature, 1978. **274**(5673): p. 775-80.
155. Greenblatt, M.S., W.P. Bennett, M. Hollstein, and C.C. Harris, *Mutations in the p53 tumor suppressor gene: clues to cancer etiology and molecular pathogenesis*. Cancer Res, 1994. **54**(18): p. 4855-78.

156. Magewu, A.N. and P.A. Jones, *Ubiquitous and tenacious methylation of the CpG site in codon 248 of the p53 gene may explain its frequent appearance as a mutational hot spot in human cancer*. Mol Cell Biol, 1994. **14**(6): p. 4225-32.
157. Gama-Sosa, M.A., V.A. Slagel, R.W. Trewyn, R. Oxenhandler, K.C. Kuo, C.W. Gehrke, and M. Ehrlich, *The 5-methylcytosine content of DNA from human tumors*. Nucleic Acids Res, 1983. **11**(19): p. 6883-94.
158. Wilson, A.S., B.E. Power, and P.L. Molloy, *DNA hypomethylation and human diseases*. Biochim Biophys Acta, 2007. **1775**(1): p. 138-62.
159. Sakatani, T., A. Kaneda, C.A. Iacobuzio-Donahue, M.G. Carter, S. de Boon Witzel, H. Okano, M.S. Ko, R. Ohlsson, D.L. Longo, and A.P. Feinberg, *Loss of imprinting of Igf2 alters intestinal maturation and tumorigenesis in mice*. Science, 2005. **307**(5717): p. 1976-8.
160. Eden, A., F. Gaudet, A. Waghmare, and R. Jaenisch, *Chromosomal instability and tumors promoted by DNA hypomethylation*. Science, 2003. **300**(5618): p. 455.
161. Gaudet, F., J.G. Hodgson, A. Eden, L. Jackson-Grusby, J. Dausman, J.W. Gray, H. Leonhardt, and R. Jaenisch, *Induction of tumors in mice by genomic hypomethylation*. Science, 2003. **300**(5618): p. 489-92.
162. Ehrlich, M., *The ICF syndrome, a DNA methyltransferase 3B deficiency and immunodeficiency disease*. Clin Immunol, 2003. **109**(1): p. 17-28.
163. Hoffmann, M.J. and W.A. Schulz, *Causes and consequences of DNA hypomethylation in human cancer*. Biochem Cell Biol, 2005. **83**(3): p. 296-321.
164. Miki, Y., I. Nishisho, A. Horii, Y. Miyoshi, J. Utsunomiya, K.W. Kinzler, B. Vogelstein, and Y. Nakamura, *Disruption of the APC gene by a retrotransposal insertion of L1 sequence in a colon cancer*. Cancer Res, 1992. **52**(3): p. 643-5.
165. Howard, G., R. Eiges, F. Gaudet, R. Jaenisch, and A. Eden, *Activation and transposition of endogenous retroviral elements in hypomethylation induced tumors in mice*. Oncogene, 2008. **27**(3): p. 404-8.
166. Sato, N., N. Fukushima, H. Matsubayashi, and M. Goggins, *Identification of maspin and S100P as novel hypomethylation targets in pancreatic cancer using global gene expression profiling*. Oncogene, 2004. **23**(8): p. 1531-8.
167. Guo, Y., P. Pakneshan, J. Gladu, A. Slack, M. Szyf, and S.A. Rabbani, *Regulation of DNA methylation in human breast cancer. Effect on the urokinase-type plasminogen activator gene production and tumor invasion*. J Biol Chem, 2002. **277**(44): p. 41571-9.
168. Hanada, M., D. Delia, A. Aiello, E. Stadtmauer, and J.C. Reed, *bcl-2 gene hypomethylation and high-level expression in B-cell chronic lymphocytic leukemia*. Blood, 1993. **82**(6): p. 1820-8.
169. Feinberg, A.P. and B. Vogelstein, *Hypomethylation distinguishes genes of some human cancers from their normal counterparts*. Nature, 1983. **301**(5895): p. 89-92.
170. Knudson, A.G., *Two genetic hits (more or less) to cancer*. Nat Rev Cancer, 2001. **1**(2): p. 157-62.
171. Sakai, T., J. Toguchida, N. Ohtani, D.W. Yandell, J.M. Rapaport, and T.P. Dryja, *Allele-specific hypermethylation of the retinoblastoma tumor-suppressor gene*. Am J Hum Genet, 1991. **48**(5): p. 880-8.
172. Stirzaker, C., D.S. Millar, C.L. Paul, P.M. Warnecke, J. Harrison, P.C. Vincent, M. Frommer, and S.J. Clark, *Extensive DNA methylation spanning the Rb promoter in retinoblastoma tumors*. Cancer Res, 1997. **57**(11): p. 2229-37.

173. Merlo, A., J.G. Herman, L. Mao, D.J. Lee, E. Gabrielson, P.C. Burger, S.B. Baylin, and D. Sidransky, *5' CpG island methylation is associated with transcriptional silencing of the tumour suppressor p16/CDKN2/MTS1 in human cancers*. Nat Med, 1995. 1(7): p. 686-92.
174. Herman, J.G., A. Merlo, L. Mao, R.G. Lapidus, J.P. Issa, N.E. Davidson, D. Sidransky, and S.B. Baylin, *Inactivation of the CDKN2/p16/MTS1 gene is frequently associated with aberrant DNA methylation in all common human cancers*. Cancer Res, 1995. 55(20): p. 4525-30.
175. Esteller, M., S. Tortola, M. Toyota, G. Capella, M.A. Peinado, S.B. Baylin, and J.G. Herman, *Hypermethylation-associated inactivation of p14(ARF) is independent of p16(INK4a) methylation and p53 mutational status*. Cancer Res, 2000. 60(1): p. 129-33.
176. Herman, J.G., A. Umar, K. Polyak, J.R. Graff, N. Ahuja, J.P. Issa, S. Markowitz, J.K. Willson, S.R. Hamilton, K.W. Kinzler, M.F. Kane, R.D. Kolodner, B. Vogelstein, T.A. Kunkel, and S.B. Baylin, *Incidence and functional consequences of hMLH1 promoter hypermethylation in colorectal carcinoma*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. 95(12): p. 6870-5.
177. Momparler, R.L., *Cancer epigenetics*. Oncogene, 2003. 22(42): p. 6479-83.
178. Gonzalez-Zulueta, M., C.M. Bender, A.S. Yang, T. Nguyen, R.W. Beart, J.M. Van Tournout, and P.A. Jones, *Methylation of the 5' CpG island of the p16/CDKN2 tumor suppressor gene in normal and transformed human tissues correlates with gene silencing*. Cancer Res, 1995. 55(20): p. 4531-5.
179. Herman, J.G., J. Jen, A. Merlo, and S.B. Baylin, *Hypermethylation-associated inactivation indicates a tumor suppressor role for p15INK4B*. Cancer Res, 1996. 56(4): p. 722-7.
180. Cote, S., D. Sinnett, and R.L. Momparler, *Demethylation by 5-aza-2'-deoxycytidine of specific 5-methylcytosine sites in the promoter region of the retinoic acid receptor beta gene in human colon carcinoma cells*. Anticancer Drugs, 1998. 9(9): p. 743-50.
181. Dammann, R., C. Li, J.H. Yoon, P.L. Chin, S. Bates, and G.P. Pfeifer, *Epigenetic inactivation of a RAS association domain family protein from the lung tumour suppressor locus 3p21.3*. Nat Genet, 2000. 25(3): p. 315-9.
182. Teitz, T., T. Wei, M.B. Valentine, E.F. Vanin, J. Grenet, V.A. Valentine, F.G. Behm, A.T. Look, J.M. Lahti, and V.J. Kidd, *Caspase 8 is deleted or silenced preferentially in childhood neuroblastomas with amplification of MYCN*. Nat Med, 2000. 6(5): p. 529-35.
183. Stimson, K.M. and P.M. Vertino, *Methylation-mediated silencing of TMS1/ASC is accompanied by histone hypoacetylation and CpG island-localized changes in chromatin architecture*. J Biol Chem, 2002. 277(7): p. 4951-8.
184. Kissil, J.L., E. Feinstein, O. Cohen, P.A. Jones, Y.C. Tsai, M.A. Knowles, M.E. Eydmann, and A. Kimchi, *DAP-kinase loss of expression in various carcinoma and B-cell lymphoma cell lines: possible implications for role as tumor suppressor gene*. Oncogene, 1997. 15(4): p. 403-7.
185. Robertson, K.D. and P.A. Jones, *The human ARF cell cycle regulatory gene promoter is a CpG island which can be silenced by DNA methylation and down-regulated by wild-type p53*. Mol Cell Biol, 1998. 18(11): p. 6457-73.
186. Corn, P.G., S.J. Kuerbitz, M.M. van Noesel, M. Esteller, N. Compitello, S.B. Baylin, and J.G. Herman, *Transcriptional silencing of the p73 gene in acute lymphoblastic leukemia and Burkitt's lymphoma is associated with 5' CpG island methylation*. Cancer Res, 1999. 59(14): p. 3352-6.

187. Kawano, S., C.W. Miller, A.F. Gombart, C.R. Bartram, Y. Matsuo, H. Asou, A. Sakashita, J. Said, E. Tatsumi, and H.P. Koeffler, *Loss of p73 gene expression in leukemias/lymphomas due to hypermethylation*. Blood, 1999. **94**(3): p. 1113-20.
188. Ohtani-Fujita, N., T. Fujita, A. Aoike, N.E. Osifchin, P.D. Robbins, and T. Sakai, *CpG methylation inactivates the promoter activity of the human retinoblastoma tumor-suppressor gene*. Oncogene, 1993. **8**(4): p. 1063-7.
189. Li, Q., N. Ahuja, P.C. Burger, and J.P. Issa, *Methylation and silencing of the Thrombospondin-1 promoter in human cancer*. Oncogene, 1999. **18**(21): p. 3284-9.
190. Graff, J.R., J.G. Herman, R.G. Lapidus, H. Chopra, R. Xu, D.F. Jarrard, W.B. Isaacs, P.M. Pitha, N.E. Davidson, and S.B. Baylin, *E-cadherin expression is silenced by DNA hypermethylation in human breast and prostate carcinomas*. Cancer Res, 1995. **55**(22): p. 5195-9.
191. Yoshiura, K., Y. Kanai, A. Ochiai, Y. Shimoyama, T. Sugimura, and S. Hirohashi, *Silencing of the E-cadherin invasion-suppressor gene by CpG methylation in human carcinomas*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(16): p. 7416-9.
192. Bachman, K.E., J.G. Herman, P.G. Corn, A. Merlo, J.F. Costello, W.K. Cavenee, S.B. Baylin, and J.R. Graff, *Methylation-associated silencing of the tissue inhibitor of metalloproteinase-3 gene suggest a suppressor role in kidney, brain, and other human cancers*. Cancer Res, 1999. **59**(4): p. 798-802.
193. Esteller, M., *Epigenetic lesions causing genetic lesions in human cancer: promoter hypermethylation of DNA repair genes*. Eur J Cancer, 2000. **36**(18): p. 2294-300.
194. Kane, M.F., M. Loda, G.M. Gaida, J. Lipman, R. Mishra, H. Goldman, J.M. Jessup, and R. Kolodner, *Methylation of the hMLH1 promoter correlates with lack of expression of hMLH1 in sporadic colon tumors and mismatch repair-defective human tumor cell lines*. Cancer Res, 1997. **57**(5): p. 808-11.
195. Qian, X.C. and T.P. Brent, *Methylation hot spots in the 5' flanking region denote silencing of the O6-methylguanine-DNA methyltransferase gene*. Cancer Res, 1997. **57**(17): p. 3672-7.
196. Esteller, M., M. Toyota, M. Sanchez-Cespedes, G. Capella, M.A. Peinado, D.N. Watkins, J.P. Issa, D. Sidransky, S.B. Baylin, and J.G. Herman, *Inactivation of the DNA repair gene O6-methylguanine-DNA methyltransferase by promoter hypermethylation is associated with G to A mutations in K-ras in colorectal tumorigenesis*. Cancer Res, 2000. **60**(9): p. 2368-71.
197. Bianco, T., G. Chenevix-Trench, D.C. Walsh, J.E. Cooper, and A. Dobrovic, *Tumour-specific distribution of BRCA1 promoter region methylation supports a pathogenetic role in breast and ovarian cancer*. Carcinogenesis, 2000. **21**(2): p. 147-51.
198. Dobrovic, A. and D. Simpfendorfer, *Methylation of the BRCA1 gene in sporadic breast cancer*. Cancer Res, 1997. **57**(16): p. 3347-50.
199. Rice, J.C. and B.W. Futscher, *Transcriptional repression of BRCA1 by aberrant cytosine methylation, histone hypoacetylation and chromatin condensation of the BRCA1 promoter*. Nucleic Acids Res, 2000. **28**(17): p. 3233-9.
200. Kautiainen, T.L. and P.A. Jones, *DNA methyltransferase levels in tumorigenic and nontumorigenic cells in culture*. J Biol Chem, 1986. **261**(4): p. 1594-8.
201. Costello, J.F., M.C. Fruhwald, D.J. Smiraglia, L.J. Rush, G.P. Robertson, X. Gao, F.A. Wright, J.D. Feramisco, P. Peltomaki, J.C. Lang, D.E. Schuller, L. Yu, C.D. Bloomfield, M.A. Caligiuri, A. Yates, R. Nishikawa, H. Su Huang, N.J. Petrelli, X. Zhang, M.S.

- O'Dorisio, W.A. Held, W.K. Cavenee, and C. Plass, *Aberrant CpG-island methylation has non-random and tumour-type-specific patterns*. Nat Genet, 2000. **24**(2): p. 132-8.
202. Esteller, M., P.G. Corn, S.B. Baylin, and J.G. Herman, *A gene hypermethylation profile of human cancer*. Cancer Res, 2001. **61**(8): p. 3225-9.
203. D'Alessio, A.C. and M. Szyf, *Epigenetic tete-a-tete: the bilateral relationship between chromatin modifications and DNA methylation*. Biochem Cell Biol, 2006. **84**(4): p. 463-76.
204. Pradhan, S. and G.D. Kim, *The retinoblastoma gene product interacts with maintenance human DNA (cytosine-5) methyltransferase and modulates its activity*. Embo J, 2002. **21**(4): p. 779-88.
205. Gopalakrishnan, S., B.O. Van Emburgh, and K.D. Robertson, *DNA methylation in development and human disease*. Mutat Res, 2008. **647**(1-2): p. 30-8.
206. Jones, P.A. and S.B. Baylin, *The epigenomics of cancer*. Cell, 2007. **128**(4): p. 683-92.
207. Sauvageau, M. and G. Sauvageau, *Polycomb group genes: keeping stem cell activity in balance*. PLoS Biol, 2008. **6**(4): p. e113.
208. Ohm, J.E., K.M. McGarvey, X. Yu, L. Cheng, K.E. Schuebel, L. Cope, H.P. Mohammad, W. Chen, V.C. Daniel, W. Yu, D.M. Berman, T. Jenuwein, K. Pruitt, S.J. Sharkis, D.N. Watkins, J.G. Herman, and S.B. Baylin, *A stem cell-like chromatin pattern may predispose tumor suppressor genes to DNA hypermethylation and heritable silencing*. Nat Genet, 2007. **39**(2): p. 237-42.
209. Widschwendter, M., H. Fiegl, D. Egle, E. Mueller-Holzner, G. Spizzo, C. Marth, D.J. Weisenberger, M. Campan, J. Young, I. Jacobs, and P.W. Laird, *Epigenetic stem cell signature in cancer*. Nat Genet, 2007. **39**(2): p. 157-8.
210. Ehrich, M., J. Turner, P. Gibbs, L. Lipton, M. Giovannetti, C. Cantor, and D. van den Boom, *Cytosine methylation profiling of cancer cell lines*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(12): p. 4844-9.
211. Bild, A.H., G. Yao, J.T. Chang, Q. Wang, A. Potti, D. Chasse, M.B. Joshi, D. Harpole, J.M. Lancaster, A. Berchuck, J.A. Olson, Jr., J.R. Marks, H.K. Dressman, M. West, and J.R. Nevins, *Oncogenic pathway signatures in human cancers as a guide to targeted therapies*. Nature, 2006. **439**(7074): p. 353-7.
212. Sidransky, D., *Emerging molecular markers of cancer*. Nat Rev Cancer, 2002. **2**(3): p. 210-9.
213. Laird, P.W., *The power and the promise of DNA methylation markers*. Nat Rev Cancer, 2003. **3**(4): p. 253-66.
214. Potti, A., H.K. Dressman, A. Bild, R.F. Riedel, G. Chan, R. Sayer, J. Cragun, H. Cottrill, M.J. Kelley, R. Petersen, D. Harpole, J. Marks, A. Berchuck, G.S. Ginsburg, P. Febbo, J. Lancaster, and J.R. Nevins, *Genomic signatures to guide the use of chemotherapeutics*. Nat Med, 2006. **12**(11): p. 1294-300.
215. Issa, J.P., Y.L. Ottaviano, P. Celano, S.R. Hamilton, N.E. Davidson, and S.B. Baylin, *Methylation of the oestrogen receptor CpG island links ageing and neoplasia in human colon*. Nat Genet, 1994. **7**(4): p. 536-40.
216. Tabby, R. and J.P. Issa, *Cancer epigenetics*. CA Cancer J Clin, 2010. **60**(6): p. 376-92.
217. Belinsky, S.A., D.M. Klinge, J.D. Dekker, M.W. Smith, T.J. Bocklage, F.D. Gilliland, R.E. Crowell, D.D. Karp, C.A. Stidley, and M.A. Picchi, *Gene promoter methylation in plasma and sputum increases with lung cancer risk*. Clin Cancer Res, 2005. **11**(18): p. 6505-11.

218. Toyota, M., N. Ahuja, M. Ohe-Toyota, J.G. Herman, S.B. Baylin, and J.P. Issa, *CpG island methylator phenotype in colorectal cancer*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(15): p. 8681-6.
219. Shen, L., M. Toyota, Y. Kondo, E. Lin, L. Zhang, Y. Guo, N.S. Hernandez, X. Chen, S. Ahmed, K. Konishi, S.R. Hamilton, and J.P. Issa, *Integrated genetic and epigenetic analysis identifies three different subclasses of colon cancer*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(47): p. 18654-9.
220. Momparler, R.L., S. Cote, and N. Eliopoulos, *Pharmacological approach for optimization of the dose schedule of 5-Aza-2'-deoxycytidine (Decitabine) for the therapy of leukemia*. Leukemia, 1997. **11**(2): p. 175-80.
221. Issa, J.P., G. Garcia-Manero, F.J. Giles, R. Mannari, D. Thomas, S. Faderl, E. Bayar, J. Lyons, C.S. Rosenfeld, J. Cortes, and H.M. Kantarjian, *Phase I study of low-dose prolonged exposure schedules of the hypomethylating agent 5-aza-2'-deoxycytidine (decitabine) in hematopoietic malignancies*. Blood, 2004. **103**(5): p. 1635-40.
222. Kaminskas, E., A. Farrell, S. Abraham, A. Baird, L.S. Hsieh, S.L. Lee, J.K. Leighton, H. Patel, A. Rahman, R. Sridhara, Y.C. Wang, and R. Pazdur, *Approval summary: azacitidine for treatment of myelodysplastic syndrome subtypes*. Clin Cancer Res, 2005. **11**(10): p. 3604-8.
223. Gore, S.D., C. Jones, and P. Kirkpatrick, *Decitabine*. Nat Rev Drug Discov, 2006. **5**(11): p. 891-2.
224. Lohrum, M., H.G. Stunnenberg, and C. Logie, *The new frontier in cancer research: deciphering cancer epigenetics*. Int J Biochem Cell Biol, 2007. **39**(7-8): p. 1450-61.
225. Gore, S.D., S. Baylin, E. Sugar, H. Carraway, C.B. Miller, M. Carducci, M. Grever, O. Galm, T. Dauses, J.E. Karp, M.A. Rudek, M. Zhao, B.D. Smith, J. Manning, A. Jiemjit, G. Dover, A. Mays, J. Zwiebel, A. Murgo, L.J. Weng, and J.G. Herman, *Combined DNA methyltransferase and histone deacetylase inhibition in the treatment of myeloid neoplasms*. Cancer Res, 2006. **66**(12): p. 6361-9.
226. Momparler, R.L., D.Y. Bouffard, L.F. Momparler, J. Dionne, K. Belanger, and J. Ayoub, *Pilot phase I-II study on 5-aza-2'-deoxycytidine (Decitabine) in patients with metastatic lung cancer*. Anticancer Drugs, 1997. **8**(4): p. 358-68.
227. Thibault, A., W.D. Figg, R.C. Bergan, R.M. Lush, C.E. Myers, A. Tompkins, E. Reed, and D. Samid, *A phase II study of 5-aza-2'deoxyctydine (decitabine) in hormone independent metastatic (D2) prostate cancer*. Tumori, 1998. **84**(1): p. 87-9.
228. Schrump, D.S., M.R. Fischette, D.M. Nguyen, M. Zhao, X. Li, T.F. Kunst, A. Hancox, J.A. Hong, G.A. Chen, V. Pishchik, W.D. Figg, A.J. Murgo, and S.M. Steinberg, *Phase I study of decitabine-mediated gene expression in patients with cancers involving the lungs, esophagus, or pleura*. Clin Cancer Res, 2006. **12**(19): p. 5777-85.
229. Cameron, E.E., K.E. Bachman, S. Myohanen, J.G. Herman, and S.B. Baylin, *Synergy of demethylation and histone deacetylase inhibition in the re-expression of genes silenced in cancer*. Nat Genet, 1999. **21**(1): p. 103-7.
230. Gilbert, J., S.D. Gore, J.G. Herman, and M.A. Carducci, *The clinical application of targeting cancer through histone acetylation and hypomethylation*. Clin Cancer Res, 2004. **10**(14): p. 4589-96.
231. Davis, A.J., K.A. Gelmon, L.L. Siu, M.J. Moore, C.D. Britten, N. Mistry, H. Klamut, S. D'Aloisio, M. MacLean, N. Wainman, D. Ayers, P. Firby, J.M. Besterman, G.K. Reid, and E.A. Eisenhauer, *Phase I and pharmacologic study of the human DNA*

- methyltransferase antisense oligodeoxynucleotide MG98 given as a 21-day continuous infusion every 4 weeks.* Invest New Drugs, 2003. **21**(1): p. 85-97.
232. Datta, J., K. Ghoshal, W.A. Denny, S.A. Gamage, D.G. Brooke, P. Phasivongsa, S. Redkar, and S.T. Jacob, *A new class of quinoline-based DNA hypomethylating agents reactivates tumor suppressor genes by blocking DNA methyltransferase 1 activity and inducing its degradation.* Cancer Res, 2009. **69**(10): p. 4277-85.
233. Unoki, M., T. Nishidate, and Y. Nakamura, *ICBP90, an E2F-1 target, recruits HDAC1 and binds to methyl-CpG through its SRA domain.* Oncogene, 2004. **23**(46): p. 7601-10.
234. Kim, J.K., P.O. Esteve, S.E. Jacobsen, and S. Pradhan, *UHRF1 binds G9a and participates in p21 transcriptional regulation in mammalian cells.* Nucleic Acids Res, 2009. **37**(2): p. 493-505.
235. Jenkins, Y., V. Markovtsov, W. Lang, P. Sharma, D. Pearsall, J. Warner, C. Franci, B. Huang, J. Huang, G.C. Yam, J.P. Vistan, E. Pali, J. Vialard, M. Janicot, J.B. Lorens, D.G. Payan, and Y. Hitoshi, *Critical role of the ubiquitin ligase activity of UHRF1, a nuclear RING finger protein, in tumor cell growth.* Mol Biol Cell, 2005. **16**(12): p. 5621-9.
236. Mousli, M., R. Hopfner, A.Q. Abbady, D. Monte, M. Jeanblanc, P. Oudet, B. Louis, and C. Bronner, *ICBP90 belongs to a new family of proteins with an expression that is deregulated in cancer cells.* Br J Cancer, 2003. **89**(1): p. 120-7.
237. Pita, J.M., A. Banito, B.M. Cavaco, and V. Leite, *Gene expression profiling associated with the progression to poorly differentiated thyroid carcinomas.* Br J Cancer, 2009. **101**(10): p. 1782-91.
238. Unoki, M., J. Brunet, and M. Mousli, *Drug discovery targeting epigenetic codes: the great potential of UHRF1, which links DNA methylation and histone modifications, as a drug target in cancers and toxoplasmosis.* Biochem Pharmacol, 2009. **78**(10): p. 1279-88.
239. Unoki, M., J.D. Kelly, D.E. Neal, B.A. Ponder, Y. Nakamura, and R. Hamamoto, *UHRF1 is a novel molecular marker for diagnosis and the prognosis of bladder cancer.* Br J Cancer, 2009. **101**(1): p. 98-105.
240. Jeanblanc, M., M. Mousli, R. Hopfner, K. Bathami, N. Martinet, A.Q. Abbady, J.C. Siffert, E. Mathieu, C.D. Muller, and C. Bronner, *The retinoblastoma gene and its product are targeted by ICBP90: a key mechanism in the G1/S transition during the cell cycle.* Oncogene, 2005. **24**(49): p. 7337-45.
241. Alhosin, M., A. Abusnina, M. Achour, T. Sharif, C. Muller, J. Peluso, T. Chataigneau, C. Lugnier, V.B. Schini-Kerth, C. Bronner, and G. Fuhrmann, *Induction of apoptosis by thymoquinone in lymphoblastic leukemia Jurkat cells is mediated by a p73-dependent pathway which targets the epigenetic integrator UHRF1.* Biochem Pharmacol, 2010. **79**(9): p. 1251-60.
242. Sharif, T., C. Auger, M. Alhosin, C. Ebel, M. Achour, N. Etienne-Selloum, G. Fuhrmann, C. Bronner, and V.B. Schini-Kerth, *Red wine polyphenols cause growth inhibition and apoptosis in acute lymphoblastic leukaemia cells by inducing a redox-sensitive up-regulation of p73 and down-regulation of UHRF1.* Eur J Cancer, 2010. **46**(5): p. 983-94.
243. Sharif, T., C. Auger, C. Bronner, M. Alhosin, T. Klein, N. Etienne-Selloum, V.B. Schini-Kerth, and G. Fuhrmann, *Selective proapoptotic activity of polyphenols from red wine on teratocarcinoma cell, a model of cancer stem-like cell.* Invest New Drugs, 2011. **29**(2): p. 239-47.
244. Pradhan, S., D. Talbot, M. Sha, J. Benner, L. Hornstra, E. Li, R. Jaenisch, and R.J. Roberts, *Baculovirus-mediated expression and characterization of the full-length murine DNA methyltransferase.* Nucleic Acids Res, 1997. **25**(22): p. 4666-73.

245. Yoder, J.A., R.W. Yen, P.M. Vertino, T.H. Bestor, and S.B. Baylin, *New 5' regions of the murine and human genes for DNA (cytosine-5)-methyltransferase*. J Biol Chem, 1996. **271**(49): p. 31092-7.
246. Yen, R.W., P.M. Vertino, B.D. Nelkin, J.J. Yu, W. el-Deiry, A. Cumaraswamy, G.G. Lennon, B.J. Trask, P. Celano, and S.B. Baylin, *Isolation and characterization of the cDNA encoding human DNA methyltransferase*. Nucleic Acids Res, 1992. **20**(9): p. 2287-91.
247. Hsu, D.W., M.J. Lin, T.L. Lee, S.C. Wen, X. Chen, and C.K. Shen, *Two major forms of DNA (cytosine-5) methyltransferase in human somatic tissues*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(17): p. 9751-6.
248. Bonfils, C., N. Beaulieu, E. Chan, J. Cotton-Montpetit, and A.R. MacLeod, *Characterization of the human DNA methyltransferase splice variant Dnmt1b*. J Biol Chem, 2000. **275**(15): p. 10754-60.
249. Jair, K.W., K.E. Bachman, H. Suzuki, A.H. Ting, I. Rhee, R.W. Yen, S.B. Baylin, and K.E. Schuebel, *De novo CpG island methylation in human cancer cells*. Cancer Res, 2006. **66**(2): p. 682-92.
250. Leonhardt, H., A.W. Page, H.U. Weier, and T.H. Bestor, *A targeting sequence directs DNA methyltransferase to sites of DNA replication in mammalian nuclei*. Cell, 1992. **71**(5): p. 865-73.
251. Vertino, P.M., J.A. Sekowski, J.M. Coll, N. Applegren, S. Han, R.J. Hickey, and L.H. Malkas, *DNMT1 is a component of a multiprotein DNA replication complex*. Cell Cycle, 2002. **1**(6): p. 416-23.
252. Jeltsch, A., *On the enzymatic properties of Dnmt1: specificity, processivity, mechanism of linear diffusion and allosteric regulation of the enzyme*. Epigenetics, 2006. **1**(2): p. 63-6.
253. Spada, F., A. Haemmer, D. Kuch, U. Rothbauer, L. Schermelleh, E. Kremmer, T. Carell, G. Langst, and H. Leonhardt, *DNMT1 but not its interaction with the replication machinery is required for maintenance of DNA methylation in human cells*. J Cell Biol, 2007. **176**(5): p. 565-71.
254. Schermelleh, L., A. Haemmer, F. Spada, N. Rosing, D. Meilinger, U. Rothbauer, M.C. Cardoso, and H. Leonhardt, *Dynamics of Dnmt1 interaction with the replication machinery and its role in postreplicative maintenance of DNA methylation*. Nucleic Acids Res, 2007. **35**(13): p. 4301-12.
255. Carlson, L.L., A.W. Page, and T.H. Bestor, *Properties and localization of DNA methyltransferase in preimplantation mouse embryos: implications for genomic imprinting*. Genes Dev, 1992. **6**(12B): p. 2536-41.
256. Ding, F. and J.R. Chaillet, *In vivo stabilization of the Dnmt1 (cytosine-5)-methyltransferase protein*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(23): p. 14861-6.
257. Mertineit, C., J.A. Yoder, T. Taketo, D.W. Laird, J.M. Trasler, and T.H. Bestor, *Sex-specific exons control DNA methyltransferase in mammalian germ cells*. Development, 1998. **125**(5): p. 889-97.
258. Doherty, A.S., M.S. Bartolomei, and R.M. Schultz, *Regulation of stage-specific nuclear translocation of Dnmt1o during preimplantation mouse development*. Dev Biol, 2002. **242**(2): p. 255-66.
259. Aguirre-Arteta, A.M., I. Grunewald, M.C. Cardoso, and H. Leonhardt, *Expression of an alternative Dnmt1 isoform during muscle differentiation*. Cell Growth Differ, 2000. **11**(10): p. 551-9.

260. Easwaran, H.P., L. Schermelleh, H. Leonhardt, and M.C. Cardoso, *Replication-independent chromatin loading of Dnmt1 during G2 and M phases*. EMBO Rep, 2004. **5**(12): p. 1181-6.
261. Esteve, P.O., H.G. Chin, and S. Pradhan, *Human maintenance DNA (cytosine-5)-methyltransferase and p53 modulate expression of p53-repressed promoters*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(4): p. 1000-5.
262. Puto, L.A. and J.C. Reed, *Daxx represses RelB target promoters via DNA methyltransferase recruitment and DNA hypermethylation*. Genes Dev, 2008. **22**(8): p. 998-1010.
263. Smallwood, A., P.O. Esteve, S. Pradhan, and M. Carey, *Functional cooperation between HP1 and DNMT1 mediates gene silencing*. Genes Dev, 2007. **21**(10): p. 1169-78.
264. Beard, C., E. Li, and R. Jaenisch, *Loss of methylation activates Xist in somatic but not in embryonic cells*. Genes Dev, 1995. **9**(19): p. 2325-34.
265. Walsh, C.P., J.R. Chaillet, and T.H. Bestor, *Transcription of IAP endogenous retroviruses is constrained by cytosine methylation*. Nat Genet, 1998. **20**(2): p. 116-7.
266. Jackson-Grusby, L., C. Beard, R. Possemato, M. Tudor, D. Fambrough, G. Csankovszki, J. Dausman, P. Lee, C. Wilson, E. Lander, and R. Jaenisch, *Loss of genomic methylation causes p53-dependent apoptosis and epigenetic deregulation*. Nat Genet, 2001. **27**(1): p. 31-9.
267. Chen, T., S. Hevi, F. Gay, N. Tsujimoto, T. He, B. Zhang, Y. Ueda, and E. Li, *Complete inactivation of DNMT1 leads to mitotic catastrophe in human cancer cells*. Nat Genet, 2007. **39**(3): p. 391-6.
268. Robertson, K.D., S. Ait-Si-Ali, T. Yokochi, P.A. Wade, P.L. Jones, and A.P. Wolffe, *DNMT1 forms a complex with Rb, E2F1 and HDAC1 and represses transcription from E2F-responsive promoters*. Nat Genet, 2000. **25**(3): p. 338-42.
269. Tatematsu, K.I., T. Yamazaki, and F. Ishikawa, *MBD2-MBD3 complex binds to hemi-methylated DNA and forms a complex containing DNMT1 at the replication foci in late S phase*. Genes Cells, 2000. **5**(8): p. 677-88.
270. Pradhan, M., P.O. Esteve, H.G. Chin, M. Samaranayake, G.D. Kim, and S. Pradhan, *CXXC domain of human DNMT1 is essential for enzymatic activity*. Biochemistry, 2008. **47**(38): p. 10000-9.
271. Fatemi, M., A. Hermann, S. Pradhan, and A. Jeltsch, *The activity of the murine DNA methyltransferase Dnmt1 is controlled by interaction of the catalytic domain with the N-terminal part of the enzyme leading to an allosteric activation of the enzyme after binding to methylated DNA*. J Mol Biol, 2001. **309**(5): p. 1189-99.
272. Pradhan, S. and P.O. Esteve, *Allosteric activator domain of maintenance human DNA (cytosine-5) methyltransferase and its role in methylation spreading*. Biochemistry, 2003. **42**(18): p. 5321-32.
273. Song, J., O. Rechkoblit, T.H. Bestor, and D.J. Patel, *Structure of DNMT1-DNA complex reveals a role for autoinhibition in maintenance DNA methylation*. Science, 2011. **331**(6020): p. 1036-40.
274. Walker, J.R., *Structure Of The Replication Foci-Targeting Sequence Of Human Dna Cytosine Methyltransferase Dnmt1*. Structural Genomics Consortium (Sgc), 2008/9/30(3epz)).
275. Svedruzic, Z.M., *Dnmt1 structure and function*. Prog Mol Biol Transl Sci, 2011. **101**: p. 221-54.

276. Iakoucheva, L.M., P. Radivojac, C.J. Brown, T.R. O'Connor, J.G. Sikes, Z. Obradovic, and A.K. Dunker, *The importance of intrinsic disorder for protein phosphorylation*. Nucleic Acids Res, 2004. **32**(3): p. 1037-49.
277. Dunker, A.K., C.J. Brown, J.D. Lawson, L.M. Iakoucheva, and Z. Obradovic, *Intrinsic disorder and protein function*. Biochemistry, 2002. **41**(21): p. 6573-82.
278. Syeda, F., R.L. Fagan, M. Wean, G.V. Avvakumov, J.R. Walker, S. Xue, S. Dhe-Paganon, and C. Brenner, *The Replication Focus Targeting Sequence (RFTS) Domain Is a DNA-competitive Inhibitor of Dnmt1*. J Biol Chem, 2011. **286**(17): p. 15344-51.
279. Takeshita, K., I. Suetake, E. Yamashita, M. Suga, H. Narita, A. Nakagawa, and S. Tajima, *Structural insight into maintenance methylation by mouse DNA methyltransferase 1 (Dnmt1)*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. **108**(22): p. 9055-9.
280. Bigey, P., S. Ramchandani, J. Theberge, F.D. Araujo, and M. Szyf, *Transcriptional regulation of the human DNA Methyltransferase (dnmt1) gene*. Gene, 2000. **242**(1-2): p. 407-18.
281. MacLeod, A.R., J. Rouleau, and M. Szyf, *Regulation of DNA methylation by the Ras signaling pathway*. J Biol Chem, 1995. **270**(19): p. 11327-37.
282. Rouleau, J., A.R. MacLeod, and M. Szyf, *Regulation of the DNA methyltransferase by the Ras-AP-1 signaling pathway*. J Biol Chem, 1995. **270**(4): p. 1595-601.
283. Deng, C., J. Yang, J. Scott, S. Hanash, and B.C. Richardson, *Role of the ras-MAPK signaling pathway in the DNA methyltransferase response to DNA hypomethylation*. Biol Chem, 1998. **379**(8-9): p. 1113-20.
284. el-Deiry, W.S., B.D. Nelkin, P. Celano, R.W. Yen, J.P. Falco, S.R. Hamilton, and S.B. Baylin, *High expression of the DNA methyltransferase gene characterizes human neoplastic cells and progression stages of colon cancer*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1991. **88**(8): p. 3470-4.
285. Tan, H.H. and A.G. Porter, *p21(WAF1) negatively regulates DNMT1 expression in mammalian cells*. Biochem Biophys Res Commun, 2009. **382**(1): p. 171-6.
286. Peterson, E.J., O. Bogler, and S.M. Taylor, *p53-mediated repression of DNA methyltransferase 1 expression by specific DNA binding*. Cancer Res, 2003. **63**(20): p. 6579-82.
287. Lin, R.K., C.Y. Wu, J.W. Chang, L.J. Juan, H.S. Hsu, C.Y. Chen, Y.Y. Lu, Y.A. Tang, Y.C. Yang, P.C. Yang, and Y.C. Wang, *Dysregulation of p53/Spl control leads to DNA methyltransferase-1 overexpression in lung cancer*. Cancer Res, 2010. **70**(14): p. 5807-17.
288. Zhang, Y. and L. Wang, *Nuclear receptor SHP inhibition of Dnmt1 expression via ERRgamma*. FEBS Lett, 2011. **585**(9): p. 1269-75.
289. Hodge, D.R., W. Xiao, P.A. Clausen, G. Heidecker, M. Szyf, and W.L. Farrar, *Interleukin-6 regulation of the human DNA methyltransferase (HDNMT) gene in human erythroleukemia cells*. J Biol Chem, 2001. **276**(43): p. 39508-11.
290. Campbell, P.M. and M. Szyf, *Human DNA methyltransferase gene DNMT1 is regulated by the APC pathway*. Carcinogenesis, 2003. **24**(1): p. 17-24.
291. Shukla, V., X. Coumoul, T. Lahusen, R.H. Wang, X. Xu, A. Vassilopoulos, C. Xiao, M.H. Lee, Y.G. Man, M. Ouchi, T. Ouchi, and C.X. Deng, *BRCA1 affects global DNA methylation through regulation of DNMT1*. Cell Res, 2010. **20**(11): p. 1201-15.
292. Lu, R., X. Wang, Z.F. Chen, D.F. Sun, X.Q. Tian, and J.Y. Fang, *Inhibition of the extracellular signal-regulated kinase/mitogen-activated protein kinase pathway decreases DNA methylation in colon cancer cells*. J Biol Chem, 2007. **282**(16): p. 12249-59.

293. Zhang, Q., H.Y. Wang, A. Woetmann, P.N. Raghunath, N. Odum, and M.A. Wasik, *STAT3 induces transcription of the DNA methyltransferase 1 gene (DNMT1) in malignant T lymphocytes*. Blood, 2006. **108**(3): p. 1058-64.
294. Torrisani, J., A. Unterberger, S.R. Tendulkar, K. Shikimi, and M. Szyf, *AUF1 cell cycle variations define genomic DNA methylation by regulation of DNMT1 mRNA stability*. Mol Cell Biol, 2007. **27**(1): p. 395-410.
295. Braconi, C., N. Huang, and T. Patel, *MicroRNA-dependent regulation of DNA methyltransferase-1 and tumor suppressor gene expression by interleukin-6 in human malignant cholangiocytes*. Hepatology, 2010. **51**(3): p. 881-90.
296. Pan, W., S. Zhu, M. Yuan, H. Cui, L. Wang, X. Luo, J. Li, H. Zhou, Y. Tang, and N. Shen, *MicroRNA-21 and microRNA-148a contribute to DNA hypomethylation in lupus CD4+ T cells by directly and indirectly targeting DNA methyltransferase 1*. J Immunol, 2010. **184**(12): p. 6773-81.
297. Wang, H., J. Wu, X. Meng, X. Ying, Y. Zuo, R. Liu, T. Kang, and W. Huang, *MicroRNA-342 Inhibits Colorectal Cancer Cell Proliferation and Invasion by Directly Targeting DNA Methyltransferase 1*. Carcinogenesis, 2011. **32**(7): p. 1033-42.
298. Ha, K., G.E. Lee, S.S. Palii, K.D. Brown, Y. Takeda, K. Liu, K.N. Bhalla, and K.D. Robertson, *Rapid and transient recruitment of DNMT1 to DNA double-strand breaks is mediated by its interaction with multiple components of the DNA damage response machinery*. Hum Mol Genet, 2011. **20**(1): p. 126-40.
299. Palii, S.S., B.O. Van Emburgh, U.T. Sankpal, K.D. Brown, and K.D. Robertson, *DNA methylation inhibitor 5-Aza-2'-deoxycytidine induces reversible genome-wide DNA damage that is distinctly influenced by DNA methyltransferases 1 and 3B*. Mol Cell Biol, 2008. **28**(2): p. 752-71.
300. Zardo, G., A. Reale, C. Passananti, S. Pradhan, S. Buontempo, G. De Matteis, R.L. Adams, and P. Caiafa, *Inhibition of poly(ADP-ribosylation) induces DNA hypermethylation: a possible molecular mechanism*. FASEB J, 2002. **16**(10): p. 1319-21.
301. Reale, A., G.D. Matteis, G. Galleazzi, M. Zampieri, and P. Caiafa, *Modulation of DNMT1 activity by ADP-ribose polymers*. Oncogene, 2005. **24**(1): p. 13-9.
302. Fuks, F., P.J. Hurd, D. Wolf, X. Nan, A.P. Bird, and T. Kouzarides, *The methyl-CpG-binding protein MeCP2 links DNA methylation to histone methylation*. J Biol Chem, 2003. **278**(6): p. 4035-40.
303. Kimura, H. and K. Shiota, *Methyl-CpG-binding protein, MeCP2, is a target molecule for maintenance DNA methyltransferase, Dnmt1*. J Biol Chem, 2003. **278**(7): p. 4806-12.
304. Zhou, Y. and I. Grummt, *The PHD finger/bromodomain of NoRC interacts with acetylated histone H4K16 and is sufficient for rDNA silencing*. Curr Biol, 2005. **15**(15): p. 1434-8.
305. Carty, S.M. and A.L. Greenleaf, *Hyperphosphorylated C-terminal repeat domain-associating proteins in the nuclear proteome link transcription to DNA/chromatin modification and RNA processing*. Mol Cell Proteomics, 2002. **1**(8): p. 598-610.
306. Tao, Y., S. Xi, V. Briones, and K. Muegge, *Lsh mediated RNA polymerase II stalling at HoxC6 and HoxC8 involves DNA methylation*. PLoS ONE, 2010. **5**(2): p. e9163.
307. Takeshima, H., S. Yamashita, T. Shimazu, T. Niwa, and T. Ushijima, *The presence of RNA polymerase II, active or stalled, predicts epigenetic fate of promoter CpG islands*. Genome Res, 2009. **19**(11): p. 1974-82.
308. Myant, K. and I. Stancheva, *LSH cooperates with DNA methyltransferases to repress transcription*. Mol Cell Biol, 2008. **28**(1): p. 215-26.

309. Bolden, A., C. Ward, J.A. Siedlecki, and A. Weissbach, *DNA methylation. Inhibition of de novo and maintenance methylation in vitro by RNA and synthetic polynucleotides.* J Biol Chem, 1984. **259**(20): p. 12437-43.
310. Glickman, J.F., J. Flynn, and N.O. Reich, *Purification and characterization of recombinant baculovirus-expressed mouse DNA methyltransferase.* Biochem Biophys Res Commun, 1997. **230**(2): p. 280-4.
311. Chuang, L.S., H.I. Ian, T.W. Koh, H.H. Ng, G. Xu, and B.F. Li, *Human DNA-(cytosine-5) methyltransferase-PCNA complex as a target for p21WAF1.* Science, 1997. **277**(5334): p. 1996-2000.
312. Rountree, M.R., K.E. Bachman, and S.B. Baylin, *DNMT1 binds HDAC2 and a new co-repressor, DMAP1, to form a complex at replication foci.* Nat Genet, 2000. **25**(3): p. 269-77.
313. Liu, Z. and R.A. Fisher, *RGS6 interacts with DMAP1 and DNMT1 and inhibits DMAP1 transcriptional repressor activity.* J Biol Chem, 2004. **279**(14): p. 14120-8.
314. Lee, G.E., J.H. Kim, M. Taylor, and M.T. Muller, *DNA methyltransferase 1-associated protein (DMAP1) is a co-repressor that stimulates DNA methylation globally and locally at sites of double strand break repair.* J Biol Chem, 2010. **285**(48): p. 37630-40.
315. Sugiyama, Y., N. Hatano, N. Sueyoshi, I. Suetake, S. Tajima, E. Kinoshita, E. Kinoshita-Kikuta, T. Koike, and I. Kameshita, *The DNA-binding activity of mouse DNA methyltransferase 1 is regulated by phosphorylation with casein kinase 1delta/epsilon.* Biochem J, 2010. **427**(3): p. 489-97.
316. Ohsawa, K., Y. Imai, D. Ito, and S. Kohsaka, *Molecular cloning and characterization of annexin V-binding proteins with highly hydrophilic peptide structure.* J Neurochem, 1996. **67**(1): p. 89-97.
317. Esteve, P.O., H.G. Chin, A. Smallwood, G.R. Feehery, O. Gangisetty, A.R. Karpf, M.F. Carey, and S. Pradhan, *Direct interaction between DNMT1 and G9a coordinates DNA and histone methylation during replication.* Genes Dev, 2006. **20**(22): p. 3089-103.
318. Zhou, Q., A.T. Agoston, P. Atadja, W.G. Nelson, and N.E. Davidson, *Inhibition of histone deacetylases promotes ubiquitin-dependent proteasomal degradation of DNA methyltransferase 1 in human breast cancer cells.* Mol Cancer Res, 2008. **6**(5): p. 873-83.
319. Zhang, X. and G.L. Verdine, *Mammalian DNA cytosine-5 methyltransferase interacts with p23 protein.* FEBS Lett, 1996. **392**(2): p. 179-83.
320. Esteve, P.O., H.G. Chin, J. Benner, G.R. Feehery, M. Samaranayake, G.A. Horwitz, S.E. Jacobsen, and S. Pradhan, *Regulation of DNMT1 stability through SET7-mediated lysine methylation in mammalian cells.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(13): p. 5076-81.
321. Kiskinis, E., M. Hallberg, M. Christian, M. Olofsson, S.M. Dilworth, R. White, and M.G. Parker, *RIP140 directs histone and DNA methylation to silence Ucp1 expression in white adipocytes.* EMBO J, 2007. **26**(23): p. 4831-40.
322. Esteve, P.O., Y. Chang, M. Samaranayake, A.K. Upadhyay, J.R. Horton, G.R. Feehery, X. Cheng, and S. Pradhan, *A methylation and phosphorylation switch between an adjacent lysine and serine determines human DNMT1 stability.* Nat Struct Mol Biol, 2011. **18**(1): p. 42-8.
323. Butler, J.S., J.H. Lee, and D.G. Skalnik, *CFPI interacts with DNMT1 independently of association with the Setd1 Histone H3K4 methyltransferase complexes.* DNA Cell Biol, 2008. **27**(10): p. 533-43.
324. Vire, E., C. Brenner, R. Deplus, L. Blanchon, M. Fraga, C. Didelot, L. Morey, A. Van Eynde, D. Bernard, J.M. Vanderwinden, M. Bollen, M. Esteller, L. Di Croce, Y. de

- Launoit, and F. Fuks, *The Polycomb group protein EZH2 directly controls DNA methylation*. Nature, 2006. **439**(7078): p. 871-4.
325. Fuks, F., W.A. Burgers, A. Brehm, L. Hughes-Davies, and T. Kouzarides, *DNA methyltransferase Dnmt1 associates with histone deacetylase activity*. Nat Genet, 2000. **24**(1): p. 88-91.
326. Geiman, T.M., U.T. Sankpal, A.K. Robertson, Y. Zhao, and K.D. Robertson, *DNMT3B interacts with hSNF2H chromatin remodeling enzyme, HDACs 1 and 2, and components of the histone methylation system*. Biochem Biophys Res Commun, 2004. **318**(2): p. 544-55.
327. Santoro, R., J. Li, and I. Grummt, *The nucleolar remodeling complex NoRC mediates heterochromatin formation and silencing of ribosomal gene transcription*. Nat Genet, 2002. **32**(3): p. 393-6.
328. Muromoto, R., K. Sugiyama, A. Takachi, S. Imoto, N. Sato, T. Yamamoto, K. Oritani, K. Shimoda, and T. Matsuda, *Physical and functional interactions between Daxx and DNA methyltransferase 1-associated protein, DMAP1*. J Immunol, 2004. **172**(5): p. 2985-93.
329. Lee, B. and M.T. Muller, *SUMOylation enhances DNA methyltransferase 1 activity*. Biochem J, 2009. **421**(3): p. 449-61.
330. Glickman, J.F., J.G. Pavlovich, and N.O. Reich, *Peptide mapping of the murine DNA methyltransferase reveals a major phosphorylation site and the start of translation*. J Biol Chem, 1997. **272**(28): p. 17851-7.
331. Du, Z., J. Song, Y. Wang, Y. Zhao, K. Guda, S. Yang, H.Y. Kao, Y. Xu, J. Willis, S.D. Markowitz, D. Sedwick, R.M. Ewing, and Z. Wang, *DNMT1 stability is regulated by proteins coordinating deubiquitination and acetylation-driven ubiquitination*. Sci Signal, 2010. **3**(146): p. ra80.
332. Qin, W., H. Leonhardt, and F. Spada, *Usp7 and Uhrf1 control ubiquitination and stability of the maintenance DNA methyltransferase Dnmt1*. J Cell Biochem, 2011. **112**(2): p. 439-44.
333. Denis, H., M.N. Ndlovu, and F. Fuks, *Regulation of mammalian DNA methyltransferases: a route to new mechanisms*. EMBO Rep, 2011. **12**(7): p. 1047-56.
334. Wang, J., S. Hevi, J.K. Kurash, H. Lei, F. Gay, J. Bajko, H. Su, W. Sun, H. Chang, G. Xu, F. Gaudet, E. Li, and T. Chen, *The lysine demethylase LSD1 (KDM1) is required for maintenance of global DNA methylation*. Nat Genet, 2009. **41**(1): p. 125-9.
335. Bronner, C., *Control of DNMT1 abundance in epigenetic inheritance by acetylation, ubiquitylation, and the histone code*. Sci Signal, 2011. **4**(157): p. pe3.
336. Olsen, J.V., B. Blagoev, F. Gnad, B. Macek, C. Kumar, P. Mortensen, and M. Mann, *Global, in vivo, and site-specific phosphorylation dynamics in signaling networks*. Cell, 2006. **127**(3): p. 635-48.
337. Dephoure, N., C. Zhou, J. Villen, S.A. Beausoleil, C.E. Bakalarski, S.J. Elledge, and S.P. Gygi, *A quantitative atlas of mitotic phosphorylation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(31): p. 10762-7.
338. Beausoleil, S.A., M. Jedrychowski, D. Schwartz, J.E. Elias, J. Villen, J. Li, M.A. Cohn, L.C. Cantley, and S.P. Gygi, *Large-scale characterization of HeLa cell nuclear phosphoproteins*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(33): p. 12130-5.
339. Cantin, G.T., W. Yi, B. Lu, S.K. Park, T. Xu, J.D. Lee, and J.R. Yates, 3rd, *Combining protein-based IMAC, peptide-based IMAC, and MudPIT for efficient phosphoproteomic analysis*. J Proteome Res, 2008. **7**(3): p. 1346-51.

340. Chen, R.Q., Q.K. Yang, B.W. Lu, W. Yi, G. Cantin, Y.L. Chen, C. Fearn, J.R. Yates, 3rd, and J.D. Lee, *CDC25B mediates rapamycin-induced oncogenic responses in cancer cells*. *Cancer Res*, 2009. **69**(6): p. 2663-8.
341. Molina, H., D.M. Horn, N. Tang, S. Mathivanan, and A. Pandey, *Global proteomic profiling of phosphopeptides using electron transfer dissociation tandem mass spectrometry*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007. **104**(7): p. 2199-204.
342. Gauci, S., A.O. Helbig, M. Slijper, J. Krijgsveld, A.J. Heck, and S. Mohammed, *Lys-N and trypsin cover complementary parts of the phosphoproteome in a refined SCX-based approach*. *Anal Chem*, 2009. **81**(11): p. 4493-501.
343. Mayya, V., D.H. Lundgren, S.I. Hwang, K. Rezaul, L. Wu, J.K. Eng, V. Rodionov, and D.K. Han, *Quantitative phosphoproteomic analysis of T cell receptor signaling reveals system-wide modulation of protein-protein interactions*. *Sci Signal*, 2009. **2**(84): p. ra46.
344. Tsai, C.F., Y.T. Wang, Y.R. Chen, C.Y. Lai, P.Y. Lin, K.T. Pan, J.Y. Chen, K.H. Khoo, and Y.J. Chen, *Immobilized metal affinity chromatography revisited: pH/acid control toward high selectivity in phosphoproteomics*. *J Proteome Res*, 2008. **7**(9): p. 4058-69.
345. Goyal, R., P. Rathert, H. Laser, H. Gowher, and A. Jeltsch, *Phosphorylation of serine-515 activates the Mammalian maintenance methyltransferase Dnmt1*. *Epigenetics*, 2007. **2**(3): p. 155-60.
346. Iliuk, A.B., V.A. Martin, B.M. Alicie, R.L. Geahlen, and W.A. Tao, *In-depth analyses of kinase-dependent tyrosine phosphoproteomes based on metal ion-functionalized soluble nanopolymer*. *Mol Cell Proteomics*, 2010. **9**(10): p. 2162-72.
347. Rikova, K., A. Guo, Q. Zeng, A. Possemato, J. Yu, H. Haack, J. Nardone, K. Lee, C. Reeves, Y. Li, Y. Hu, Z. Tan, M. Stokes, L. Sullivan, J. Mitchell, R. Wetzel, J. Macneill, J.M. Ren, J. Yuan, C.E. Bakalarski, J. Villen, J.M. Kornhauser, B. Smith, D. Li, X. Zhou, S.P. Gygi, T.L. Gu, R.D. Polakiewicz, J. Rush, and M.J. Comb, *Global survey of phosphotyrosine signaling identifies oncogenic kinases in lung cancer*. *Cell*, 2007. **131**(6): p. 1190-203.
348. Gu, T.L., T. Mercher, J.W. Tyner, V.L. Goss, D.K. Walters, M.G. Cornejo, C. Reeves, L. Popova, K. Lee, M.C. Heinrich, J. Rush, M. Daibata, I. Miyoshi, D.G. Gilliland, B.J. Druker, and R.D. Polakiewicz, *A novel fusion of RBM6 to CSF1R in acute megakaryoblastic leukemia*. *Blood*, 2007. **110**(1): p. 323-33.
349. Bennetzen, M.V., D.H. Larsen, J. Bunkenborg, J. Bartek, J. Lukas, and J.S. Andersen, *Site-specific phosphorylation dynamics of the nuclear proteome during the DNA damage response*. *Mol Cell Proteomics*, 2010. **9**(6): p. 1314-23.
350. Ge, F., C.L. Xiao, X.F. Yin, C.H. Lu, H.L. Zeng, and Q.Y. He, *Phosphoproteomic analysis of primary human multiple myeloma cells*. *J Proteomics*, 2010. **73**(7): p. 1381-90.
351. Olsen, J.V., M. Vermeulen, A. Santamaria, C. Kumar, M.L. Miller, L.J. Jensen, F. Gnad, J. Cox, T.S. Jensen, E.A. Nigg, S. Brunak, and M. Mann, *Quantitative phosphoproteomics reveals widespread full phosphorylation site occupancy during mitosis*. *Sci Signal*, 2010. **3**(104): p. ra3.
352. Nagano, K., T. Shinkawa, H. Mutoh, O. Kondoh, S. Morimoto, N. Inomata, M. Ashihara, N. Ishii, Y. Aoki, and M. Haramura, *Phosphoproteomic analysis of distinct tumor cell lines in response to nocodazole treatment*. *Proteomics*, 2009. **9**(10): p. 2861-74.
353. Brill, L.M., W. Xiong, K.B. Lee, S.B. Ficarro, A. Crain, Y. Xu, A. Terskikh, E.Y. Snyder, and S. Ding, *Phosphoproteomic analysis of human embryonic stem cells*. *Cell Stem Cell*, 2009. **5**(2): p. 204-13.

354. Van Hoof, D., J. Munoz, S.R. Braam, M.W. Pinkse, R. Linding, A.J. Heck, C.L. Mummery, and J. Krijgsveld, *Phosphorylation dynamics during early differentiation of human embryonic stem cells*. Cell Stem Cell, 2009. 5(2): p. 214-26.
355. Rigbolt, K.T., T.A. Prokhorova, V. Akimov, J. Henningsen, P.T. Johansen, I. Kratchmarova, M. Kassem, M. Mann, J.V. Olsen, and B. Blagoev, *System-wide temporal characterization of the proteome and phosphoproteome of human embryonic stem cell differentiation*. Sci Signal, 2011. 4(164): p. rs3.
356. Sun, L., H. Zhao, Z. Xu, Q. Liu, Y. Liang, L. Wang, X. Cai, L. Zhang, L. Hu, G. Wang, and X. Zha, *Phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B pathway stabilizes DNA methyltransferase I protein and maintains DNA methylation*. Cell Signal, 2007. 19(11): p. 2255-63.
357. Hodge, D.R., E. Cho, T.D. Copeland, T. Guszczynski, E. Yang, A.K. Seth, and W.L. Farrar, *IL-6 enhances the nuclear translocation of DNA cytosine-5-methyltransferase 1 (DNMT1) via phosphorylation of the nuclear localization sequence by the AKT kinase*. Cancer Genomics Proteomics, 2007. 4(6): p. 387-98.
358. Hervouet, E., L. Lalier, E. Debien, M. Cheray, A. Geairon, H. Rogniaux, D. Loussouarn, S.A. Martin, F.M. Vallette, and P.F. Cartron, *Disruption of Dnmt1/PCNA/UHRF1 interactions promotes tumorigenesis from human and mice glial cells*. PLoS ONE, 2010. 5(6): p. e11333.
359. Levenson, J.M., T.L. Roth, F.D. Lubin, C.A. Miller, I.C. Huang, P. Desai, L.M. Malone, and J.D. Sweatt, *Evidence that DNA (cytosine-5) methyltransferase regulates synaptic plasticity in the hippocampus*. J Biol Chem, 2006. 281(23): p. 15763-73.
360. Kameshita, I., M. Sekiguchi, D. Hamasaki, Y. Sugiyama, N. Hatano, I. Suetake, S. Tajima, and N. Sueyoshi, *Cyclin-dependent kinase-like 5 binds and phosphorylates DNA methyltransferase 1*. Biochem Biophys Res Commun, 2008. 377(4): p. 1162-7.
361. Manning, G., D.B. Whyte, R. Martinez, T. Hunter, and S. Sudarsanam, *The protein kinase complement of the human genome*. Science, 2002. 298(5600): p. 1912-34.
362. Cohen, P., *Protein kinases--the major drug targets of the twenty-first century?* Nat Rev Drug Discov, 2002. 1(4): p. 309-15.
363. Le Calvez, H., *Kinases in Cancer*. The Translational Post, 2001. 1(1).
364. Dhanasekaran, N. and E. Premkumar Reddy, *Signaling by dual specificity kinases*. Oncogene, 1998. 17(11 Reviews): p. 1447-55.
365. Kennelly, P.J. and E.G. Krebs, *Consensus sequences as substrate specificity determinants for protein kinases and protein phosphatases*. J Biol Chem, 1991. 266(24): p. 15555-8.
366. Roach, P.J., *Multisite and hierachal protein phosphorylation*. J Biol Chem, 1991. 266(22): p. 14139-42.
367. Hanks, S.K. and T. Hunter, *Protein kinases 6. The eukaryotic protein kinase superfamily: kinase (catalytic) domain structure and classification*. FASEB J, 1995. 9(8): p. 576-96.
368. Shchemelinin, I., L. Sefc, and E. Necas, *Protein kinases, their function and implication in cancer and other diseases*. Folia Biol (Praha), 2006. 52(3): p. 81-100.
369. Banchio, C., L.M. Schang, and D.E. Vance, *Phosphorylation of Sp1 by cyclin-dependent kinase 2 modulates the role of Sp1 in CTP:phosphocholine cytidylyltransferase alpha regulation during the S phase of the cell cycle*. J Biol Chem, 2004. 279(38): p. 40220-6.
370. Schang, L.M., *Advances on cyclin-dependent kinases (CDKs) as novel targets for antiviral drugs*. Curr Drug Targets Infect Disord, 2005. 5(1): p. 29-37.
371. Malumbres, M. and M. Barbacid, *Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm*. Nat Rev Cancer, 2009. 9(3): p. 153-66.

372. Johnson, G.L., H.G. Dohlman, and L.M. Graves, *MAPK kinase kinases (MKKs) as a target class for small-molecule inhibition to modulate signaling networks and gene expression*. Curr Opin Chem Biol, 2005. 9(3): p. 325-31.
373. Cargnello, M. and P.P. Roux, *Activation and function of the MAPKs and their substrates, the MAPK-activated protein kinases*. Microbiol Mol Biol Rev, 2011. 75(1): p. 50-83.
374. Fields, A.P. and W.C. Gustafson, *Protein kinase C in disease: cancer*. Methods Mol Biol, 2003. 233: p. 519-37.
375. Jenny, M., O.A. Wrulich, W. Schwaiger, and F. Ueberall, *Relevance of atypical protein kinase C isoforms to the drug discovery process*. Chembiochem, 2005. 6(3): p. 491-9.
376. Brazil, D.P. and B.A. Hemmings, *Ten years of protein kinase B signalling: a hard Akt to follow*. Trends Biochem Sci, 2001. 26(11): p. 657-64.
377. Manning, B.D. and L.C. Cantley, *AKT/PKB signaling: navigating downstream*. Cell, 2007. 129(7): p. 1261-74.
378. Mora, A., D. Komander, D.M. van Aalten, and D.R. Alessi, *PDK1, the master regulator of AGC kinase signal transduction*. Semin Cell Dev Biol, 2004. 15(2): p. 161-70.
379. Filhol, O. and C. Cochet, *Protein kinase CK2 in health and disease: Cellular functions of protein kinase CK2: a dynamic affair*. Cell Mol Life Sci, 2009. 66(11-12): p. 1830-9.
380. Litchfield, D.W. and B. Luscher, *Casein kinase II in signal transduction and cell cycle regulation*. Mol Cell Biochem, 1993. 127-128: p. 187-99.
381. Yamauchi, T., *Neuronal Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II--discovery, progress in a quarter of a century, and perspective: implication for learning and memory*. Biol Pharm Bull, 2005. 28(8): p. 1342-54.
382. Anderson, M.E., *Calmodulin kinase signaling in heart: an intriguing candidate target for therapy of myocardial dysfunction and arrhythmias*. Pharmacol Ther, 2005. 106(1): p. 39-55.
383. McGargill, M.A., L.L. Sharp, J.D. Bui, S.M. Hedrick, and S. Calbo, *Active Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II gamma B impairs positive selection of T cells by modulating TCR signaling*. J Immunol, 2005. 175(2): p. 656-64.
384. Lin, M.Y., T. Zal, I.L. Ch'en, N.R. Gascoigne, and S.M. Hedrick, *A pivotal role for the multifunctional calcium/calmodulin-dependent protein kinase II in T cells: from activation to unresponsiveness*. J Immunol, 2005. 174(9): p. 5583-92.
385. Cohen, P. and S. Frame, *The renaissance of GSK3*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2001. 2(10): p. 769-76.
386. Naviglio, S., M. Caraglia, A. Abbruzzese, E. Chiosi, D. Di Gesto, M. Marra, M. Romano, A. Sorrentino, L. Sorvillo, A. Spina, and G. Illiano, *Protein kinase A as a biological target in cancer therapy*. Expert Opin Ther Targets, 2009. 13(1): p. 83-92.
387. Matyakhina, L., S.M. Lenherr, and C.A. Stratakis, *Protein kinase A and chromosomal stability*. Ann N Y Acad Sci, 2002. 968: p. 148-57.
388. Rykx, A., L. De Kimpe, S. Mikhalap, T. Vantus, T. Seufferlein, J.R. Vandenhende, and J. Van Lint, *Protein kinase D: a family affair*. FEBS Lett, 2003. 546(1): p. 81-6.
389. Inoue, M., A. Kishimoto, Y. Takai, and Y. Nishizuka, *Studies on a cyclic nucleotide-independent protein kinase and its proenzyme in mammalian tissues. II. Proenzyme and its activation by calcium-dependent protease from rat brain*. J Biol Chem, 1977. 252(21): p. 7610-6.
390. Steinberg, S.F., *Structural basis of protein kinase C isoform function*. Physiol Rev, 2008. 88(4): p. 1341-78.

391. Jaken, S., *Protein kinase C isoforms and substrates*. Curr Opin Cell Biol, 1996. 8(2): p. 168-73.
392. Dekker, L.V., R.H. Palmer, and P.J. Parker, *The protein kinase C and protein kinase C related gene families*. Curr Opin Struct Biol, 1995. 5(3): p. 396-402.
393. Mellor, H. and P.J. Parker, *The extended protein kinase C superfamily*. Biochem J, 1998. 332 ( Pt 2): p. 281-92.
394. Moscat, J., M.T. Diaz-Meco, A. Albert, and S. Campuzano, *Cell signaling and function organized by PBl domain interactions*. Mol Cell, 2006. 23(5): p. 631-40.
395. Moscat, J., P. Rennert, and M.T. Diaz-Meco, *PKCzeta at the crossroad of NF-kappaB and Jak1/Stat6 signaling pathways*. Cell Death Differ, 2006. 13(5): p. 702-11.
396. Parekh, D.B., W. Ziegler, and P.J. Parker, *Multiple pathways control protein kinase C phosphorylation*. EMBO J, 2000. 19(4): p. 496-503.
397. White, W.O., M.L. Seibenhener, and M.W. Wooten, *Phosphorylation of tyrosine 256 facilitates nuclear import of atypical protein kinase C*. J Cell Biochem, 2002. 85(1): p. 42-53.
398. Feng, X., K.P. Becker, S.D. Stribling, K.G. Peters, and Y.A. Hannun, *Regulation of receptor-mediated protein kinase C membrane trafficking by autophosphorylation*. J Biol Chem, 2000. 275(22): p. 17024-34.
399. Feng, X. and Y.A. Hannun, *An essential role for autophosphorylation in the dissociation of activated protein kinase C from the plasma membrane*. J Biol Chem, 1998. 273(41): p. 26870-4.
400. Becker, K.P. and Y.A. Hannun, *cPKC-dependent sequestration of membrane-recycling components in a subset of recycling endosomes*. J Biol Chem, 2003. 278(52): p. 52747-54.
401. Idkowiak-Baldys, J., K.P. Becker, K. Kitatani, and Y.A. Hannun, *Dynamic sequestration of the recycling compartment by classical protein kinase C*. J Biol Chem, 2006. 281(31): p. 22321-31.
402. Parton, R.G. and K. Simons, *The multiple faces of caveolae*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2007. 8(3): p. 185-94.
403. Lasfer, M., L. Davenne, N. Vadrot, C. Alexia, Z. Sadji-Ouatas, A.F. Bringuier, G. Feldmann, D. Pessaire, and F. Reyl-Desmars, *Protein kinase PKC delta and c-Abl are required for mitochondrial apoptosis induction by genotoxic stress in the absence of p53, p73 and Fas receptor*. FEBS Lett, 2006. 580(11): p. 2547-52.
404. Maissel, A., M. Marom, M. Shtutman, G. Shahaf, and E. Livneh, *PKCeta is localized in the Golgi, ER and nuclear envelope and translocates to the nuclear envelope upon PMA activation and serum-starvation: C1b domain and the pseudosubstrate containing fragment target PKCeta to the Golgi and the nuclear envelope*. Cell Signal, 2006. 18(8): p. 1127-39.
405. Kajimoto, T., Y. Shirai, N. Sakai, T. Yamamoto, H. Matsuzaki, U. Kikkawa, and N. Saito, *Ceramide-induced apoptosis by translocation, phosphorylation, and activation of protein kinase Cdelta in the Golgi complex*. J Biol Chem, 2004. 279(13): p. 12668-76.
406. Olson, E.N., R. Burgess, and J. Staudinger, *Protein kinase C as a transducer of nuclear signals*. Cell Growth Differ, 1993. 4(8): p. 699-705.
407. Buchner, K., *Protein kinase C in the transduction of signals toward and within the cell nucleus*. Eur J Biochem, 1995. 228(2): p. 211-21.

408. DeVries, T.A., M.C. Neville, and M.E. Reyland, *Nuclear import of PKCdelta is required for apoptosis: identification of a novel nuclear import sequence*. EMBO J, 2002. **21**(22): p. 6050-60.
409. Wooten, M.W., G. Zhou, M.C. Wooten, and M.L. Seibenhener, *Transport of protein kinase C isoforms to the nucleus of PC12 cells by nerve growth factor: association of atypical zeta-PKC with the nuclear matrix*. J Neurosci Res, 1997. **49**(4): p. 393-403.
410. Saito, N. and Y. Shirai, *Protein kinase C gamma (PKC gamma): function of neuron specific isotype*. J Biochem, 2002. **132**(5): p. 683-7.
411. Kashiwagi, M., M. Ohba, K. Chida, and T. Kuroki, *Protein kinase C eta (PKC eta): its involvement in keratinocyte differentiation*. J Biochem, 2002. **132**(6): p. 853-7.
412. Altman, A. and M. Villalba, *Protein kinase C-theta (PKC theta): a key enzyme in T cell life and death*. J Biochem, 2002. **132**(6): p. 841-6.
413. Wetsel, W.C., W.A. Khan, I. Merchenthaler, H. Rivera, A.E. Halpern, H.M. Phung, A. Negro-Vilar, and Y.A. Hannun, *Tissue and cellular distribution of the extended family of protein kinase C isoenzymes*. J Cell Biol, 1992. **117**(1): p. 121-33.
414. Kikkawa, U., H. Matsuzaki, and T. Yamamoto, *Protein kinase C delta (PKC delta): activation mechanisms and functions*. J Biochem, 2002. **132**(6): p. 831-9.
415. Lu, Z., A. Hornia, Y.W. Jiang, Q. Zang, S. Ohno, and D.A. Foster, *Tumor promotion by depleting cells of protein kinase C delta*. Mol Cell Biol, 1997. **17**(6): p. 3418-28.
416. Cerdá, S.R., M. Bissonnette, B. Scaglione-Sewell, M.R. Lyons, S. Khare, R. Mustafi, and T.A. Brasitus, *PKC-delta inhibits anchorage-dependent and -independent growth, enhances differentiation, and increases apoptosis in CaCo-2 cells*. Gastroenterology, 2001. **120**(7): p. 1700-12.
417. Mandil, R., E. Ashkenazi, M. Blass, I. Kronfeld, G. Kazimirsky, G. Rosenthal, F. Umansky, P.S. Lorenzo, P.M. Blumberg, and C. Brodie, *Protein kinase Calpha and protein kinase Cdelta play opposite roles in the proliferation and apoptosis of glioma cells*. Cancer Res, 2001. **61**(11): p. 4612-9.
418. Sun, X.G. and S.A. Rotenberg, *Overexpression of protein kinase Calpha in MCF-10A human breast cells engenders dramatic alterations in morphology, proliferation, and motility*. Cell Growth Differ, 1999. **10**(5): p. 343-52.
419. Nakashima, S., *Protein kinase C alpha (PKC alpha): regulation and biological function*. J Biochem, 2002. **132**(5): p. 669-75.
420. Roffey, J., C. Rosse, M. Linch, A. Hibbert, N.Q. McDonald, and P.J. Parker, *Protein kinase C intervention: the state of play*. Curr Opin Cell Biol, 2009. **21**(2): p. 268-79.
421. Farese, R.V., M.P. Sajan, H. Yang, P. Li, S. Mastorides, W.R. Gower, Jr., S. Nimal, C.S. Choi, S. Kim, G.I. Shulman, C.R. Kahn, U. Braun, and M. Leitges, *Muscle-specific knockout of PKC-lambda impairs glucose transport and induces metabolic and diabetic syndromes*. J Clin Invest, 2007. **117**(8): p. 2289-301.
422. Neuzil, J., T. Weber, A. Schroder, M. Lu, G. Ostermann, N. Gellert, G.C. Mayne, B. Olejnicka, A. Negre-Salvayre, M. Sticha, R.J. Coffey, and C. Weber, *Induction of cancer cell apoptosis by alpha-tocopheryl succinate: molecular pathways and structural requirements*. FASEB J, 2001. **15**(2): p. 403-15.
423. Shen, L., N.M. Dean, and R.I. Glazer, *Induction of p53-dependent, insulin-like growth factor-binding protein-3-mediated apoptosis in glioblastoma multiforme cells by a protein kinase Calpha antisense oligonucleotide*. Mol Pharmacol, 1999. **55**(2): p. 396-402.
424. Haslauer, M., K. Baltensperger, and H. Porzig, *Erythropoietin- and stem cell factor-induced DNA synthesis in normal human erythroid progenitor cells requires activation of*

- protein kinase C $\alpha$  and is strongly inhibited by thrombin.* Blood, 1999. **94**(1): p. 114-26.
425. Wallis, S., S. Lloyd, I. Wise, G. Ireland, T.P. Fleming, and D. Garrod, *The alpha isoform of protein kinase C is involved in signaling the response of desmosomes to wounding in cultured epithelial cells.* Mol Biol Cell, 2000. **11**(3): p. 1077-92.
426. Leitges, M., C. Schmedt, R. Guinamard, J. Davoust, S. Schaal, S. Stabel, and A. Tarakhovsky, *Immunodeficiency in protein kinase C $\beta$ -deficient mice.* Science, 1996. **273**(5276): p. 788-91.
427. Kang, S.W., M.I. Wahl, J. Chu, J. Kitaura, Y. Kawakami, R.M. Kato, R. Tabuchi, A. Tarakhovsky, T. Kawakami, C.W. Turck, O.N. Witte, and D.J. Rawlings, *PKC $\beta$  modulates antigen receptor signaling via regulation of Btk membrane localization.* EMBO J, 2001. **20**(20): p. 5692-702.
428. Nechushtan, H., M. Leitges, C. Cohen, G. Kay, and E. Razin, *Inhibition of degranulation and interleukin-6 production in mast cells derived from mice deficient in protein kinase C $\beta$ .* Blood, 2000. **95**(5): p. 1752-7.
429. Ozawa, K., Z. Szallasi, M.G. Kazanietz, P.M. Blumberg, H. Mischak, J.F. Mushinski, and M.A. Beaven, *Ca(2+)-dependent and Ca(2+)-independent isozymes of protein kinase C mediate exocytosis in antigen-stimulated rat basophilic RBL-2H3 cells. Reconstitution of secretory responses with Ca $^{2+}$  and purified isozymes in washed permeabilized cells.* J Biol Chem, 1993. **268**(3): p. 1749-56.
430. Formisano, P., F. Oriente, F. Fiory, M. Caruso, C. Miele, M.A. Maitan, F. Andreozzi, G. Vigliotta, G. Condorelli, and F. Beguinot, *Insulin-activated protein kinase C $\beta$  bypasses Ras and stimulates mitogen-activated protein kinase activity and cell proliferation in muscle cells.* Mol Cell Biol, 2000. **20**(17): p. 6323-33.
431. Abeliovich, A., C. Chen, Y. Goda, A.J. Silva, C.F. Stevens, and S. Tonegawa, *Modified hippocampal long-term potentiation in PKC gamma-mutant mice.* Cell, 1993. **75**(7): p. 1253-62.
432. Linden, D.J. and J.A. Connor, *Participation of postsynaptic PKC in cerebellar long-term depression in culture.* Science, 1991. **254**(5038): p. 1656-9.
433. Watanabe, T., Y. Ono, Y. Taniyama, K. Hazama, K. Igarashi, K. Ogita, U. Kikkawa, and Y. Nishizuka, *Cell division arrest induced by phorbol ester in CHO cells overexpressing protein kinase C-delta subspecies.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. **89**(21): p. 10159-63.
434. Fukumoto, S., Y. Nishizawa, M. Hosoi, H. Koyama, K. Yamakawa, S. Ohno, and H. Morii, *Protein kinase C delta inhibits the proliferation of vascular smooth muscle cells by suppressing G1 cyclin expression.* J Biol Chem, 1997. **272**(21): p. 13816-22.
435. Ohba, M., K. Ishino, M. Kashiwagi, S. Kawabe, K. Chida, N.H. Huh, and T. Kuroki, *Induction of differentiation in normal human keratinocytes by adenovirus-mediated introduction of the eta and delta isoforms of protein kinase C.* Mol Cell Biol, 1998. **18**(9): p. 5199-207.
436. Reddig, P.J., N.E. Dreckschmidt, H. Ahrens, R. Simsman, C.P. Tseng, J. Zou, T.D. Oberley, and A.K. Verma, *Transgenic mice overexpressing protein kinase C $\delta$  in the epidermis are resistant to skin tumor promotion by 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate.* Cancer Res, 1999. **59**(22): p. 5710-8.
437. Li, L., P.S. Lorenzo, K. Bogi, P.M. Blumberg, and S.H. Yuspa, *Protein kinase C $\delta$  targets mitochondria, alters mitochondrial membrane potential, and induces apoptosis in normal and neoplastic keratinocytes when overexpressed by an adenoviral vector.* Mol Cell Biol, 1999. **19**(12): p. 8547-58.

438. Liedtke, C.M. and T. Cole, *Antisense oligodeoxynucleotide to PKC-delta blocks alpha 1-adrenergic activation of Na-K-2Cl cotransport*. Am J Physiol, 1997. **273**(5 Pt 1): p. C1632-40.
439. MacKenzie, S., I. Fleming, M.D. Houslay, N.G. Anderson, and E. Kilgour, *Growth hormone and phorbol esters require specific protein kinase C isoforms to activate mitogen-activated protein kinases in 3T3-F442A cells*. Biochem J, 1997. **324** ( Pt 1): p. 159-65.
440. Chen, C.C., J.K. Wang, and S.B. Lin, *Antisense oligonucleotides targeting protein kinase C-alpha, -beta I, or -delta but not -eta inhibit lipopolysaccharide-induced nitric oxide synthase expression in RAW 264.7 macrophages: involvement of a nuclear factor kappa B-dependent mechanism*. J Immunol, 1998. **161**(11): p. 6206-14.
441. Caruso, M., M.A. Maitan, G. Bifulco, C. Miele, G. Vigliotta, F. Oriente, P. Formisano, and F. Beguinot, *Activation and mitochondrial translocation of protein kinase C $\delta$  are necessary for insulin stimulation of pyruvate dehydrogenase complex activity in muscle and liver cells*. J Biol Chem, 2001. **276**(48): p. 45088-97.
442. Balciunaite, E., S. Jones, A. Toker, and A. Kazlauskas, *PDGF initiates two distinct phases of protein kinase C activity that make unequal contributions to the G0 to S transition*. Curr Biol, 2000. **10**(5): p. 261-7.
443. Basu, A. and U. Sivaprasad, *Protein kinase C $\epsilon$ psilon makes the life and death decision*. Cell Signal, 2007. **19**(8): p. 1633-42.
444. Racke, F.K., D. Wang, Z. Zaidi, J. Kelley, J. Visvader, J.W. Soh, and A.N. Goldfarb, *A potential role for protein kinase C-epsilon in regulating megakaryocytic lineage commitment*. J Biol Chem, 2001. **276**(1): p. 522-8.
445. Jobbagy, Z., Z. Olah, G. Petrovics, M.V. Eiden, B.D. Leverett, N.M. Dean, and W.B. Anderson, *Up-regulation of the Pit-2 phosphate transporter/retrovirus receptor by protein kinase C epsilon*. J Biol Chem, 1999. **274**(11): p. 7067-71.
446. Pan, Q., L.W. Bao, T.N. Teknos, and S.D. Merajver, *Targeted disruption of protein kinase C epsilon reduces cell invasion and motility through inactivation of RhoA and RhoC GTPases in head and neck squamous cell carcinoma*. Cancer Res, 2006. **66**(19): p. 9379-84.
447. Ali, I. and S.K. Sarna, *Selective modulation of PKC isozymes by inflammation in canine colonic circular muscle cells*. Gastroenterology, 2002. **122**(2): p. 483-94.
448. Mehta, K.D., A. Radominska-Pandya, G.S. Kapoor, B. Dave, and B.A. Atkins, *Critical role of diacylglycerol- and phospholipid-regulated protein kinase C epsilon in induction of low-density lipoprotein receptor transcription in response to depletion of cholesterol*. Mol Cell Biol, 2002. **22**(11): p. 3783-93.
449. DeCoy, D.L., J.R. Snapper, and M.D. Breyer, *Anti sense DNA down-regulates protein kinase C-epsilon and enhances vasopressin-stimulated Na<sup>+</sup> absorption in rabbit cortical collecting duct*. J Clin Invest, 1995. **95**(6): p. 2749-56.
450. Akita, Y., S. Ohno, Y. Yajima, Y. Konno, T.C. Saido, K. Mizuno, K. Chida, S. Osada, T. Kuroki, S. Kawashima, and et al., *Overproduction of a Ca(2+)-independent protein kinase C isozyme, nPKC epsilon, increases the secretion of prolactin from thyrotropin-releasing hormone-stimulated rat pituitary GH4C1 cells*. J Biol Chem, 1994. **269**(6): p. 4653-60.
451. Song, J.C., B.J. Hrnjez, O.C. Farokhzad, and J.B. Matthews, *PKC-epsilon regulates basolateral endocytosis in human T84 intestinal epithelia: role of F-actin and MARCKS*. Am J Physiol, 1999. **277**(6 Pt 1): p. C1239-49.

452. Morrow, T.A., S.A. Muljo, J. Zhang, J.M. Hardwick, and M.S. Schlissel, *Pro-B-cell-specific transcription and proapoptotic function of protein kinase Ceta*. Mol Cell Biol, 1999. **19**(8): p. 5608-18.
453. Altman, A., N. Isakov, and G. Baier, *Protein kinase C $\theta$ : a new essential superstar on the T-cell stage*. Immunol Today, 2000. **21**(11): p. 567-73.
454. Isakov, N. and A. Altman, *Protein kinase C( $\theta$ ) in T cell activation*. Annu Rev Immunol, 2002. **20**: p. 761-94.
455. Berra, E., M.T. Diaz-Meco, I. Dominguez, M.M. Municio, L. Sanz, J. Lozano, R.S. Chapkin, and J. Moscat, *Protein kinase C zeta isoform is critical for mitogenic signal transduction*. Cell, 1993. **74**(3): p. 555-63.
456. Diaz-Meco, M.T., J. Lozano, M.M. Municio, E. Berra, S. Frutos, L. Sanz, and J. Moscat, *Evidence for the in vitro and in vivo interaction of Ras with protein kinase C zeta*. J Biol Chem, 1994. **269**(50): p. 31706-10.
457. Kieser, A., T. Seitz, H.S. Adler, P. Coffer, E. Kremmer, P. Crespo, J.S. Gutkind, D.W. Henderson, J.F. Mushinski, W. Kolch, and H. Mischak, *Protein kinase C-zeta reverts v-raf transformation of NIH-3T3 cells*. Genes Dev, 1996. **10**(12): p. 1455-66.
458. Sanz, L., M.T. Diaz-Meco, H. Nakano, and J. Moscat, *The atypical PKC-interacting protein p62 channels NF-kappaB activation by the IL-1-TRAF6 pathway*. EMBO J, 2000. **19**(7): p. 1576-86.
459. Coleman, E.S. and M.W. Wooten, *Nerve growth factor-induced differentiation of PC12 cells employs the PMA-insensitive protein kinase C-zeta isoform*. J Mol Neurosci, 1994. **5**(1): p. 39-57.
460. Ohno, S., *Intercellular junctions and cellular polarity: the PAR-aPKC complex, a conserved core cassette playing fundamental roles in cell polarity*. Curr Opin Cell Biol, 2001. **13**(5): p. 641-8.
461. Diaz-Meco, M.T., M.M. Municio, S. Frutos, P. Sanchez, J. Lozano, L. Sanz, and J. Moscat, *The product of par-4, a gene induced during apoptosis, interacts selectively with the atypical isoforms of protein kinase C*. Cell, 1996. **86**(5): p. 777-86.
462. Bandyopadhyay, G., M.L. Standaert, L. Galloway, J. Moscat, and R.V. Farese, *Evidence for involvement of protein kinase C (PKC)-zeta and noninvolvement of diacylglycerol-sensitive PKCs in insulin-stimulated glucose transport in L6 myotubes*. Endocrinology, 1997. **138**(11): p. 4721-31.
463. Ling, D.S., L.S. Benardo, P.A. Serrano, N. Blace, M.T. Kelly, J.F. Crary, and T.C. Sacktor, *Protein kinase M $\zeta$  is necessary and sufficient for LTP maintenance*. Nat Neurosci, 2002. **5**(4): p. 295-6.
464. Murray, N.R. and A.P. Fields, *Atypical protein kinase C iota protects human leukemia cells against drug-induced apoptosis*. J Biol Chem, 1997. **272**(44): p. 27521-4.
465. Bjorkoy, G., M. Perander, A. Overvatn, and T. Johansen, *Reversion of Ras- and phosphatidylcholine-hydrolyzing phospholipase C-mediated transformation of NIH 3T3 cells by a dominant interfering mutant of protein kinase C lambda is accompanied by the loss of constitutive nuclear mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase activity*. J Biol Chem, 1997. **272**(17): p. 11557-65.
466. Bandyopadhyay, G., M.L. Standaert, U. Kikkawa, Y. Ono, J. Moscat, and R.V. Farese, *Effects of transiently expressed atypical (zeta, lambda), conventional (alpha, beta) and novel (delta, epsilon) protein kinase C isoforms on insulin-stimulated translocation of epitope-tagged GLUT4 glucose transporters in rat adipocytes: specific interchangeable effects of protein kinases C-zeta and C-lambda*. Biochem J, 1999. **337** ( Pt 3): p. 461-70.

467. Lallena, M.J., M.T. Diaz-Meco, G. Bren, C.V. Paya, and J. Moscat, *Activation of IkappaB kinase beta by protein kinase C isoforms*. Mol Cell Biol, 1999. **19**(3): p. 2180-8.
468. Jamieson, L., L. Carpenter, T.J. Biden, and A.P. Fields, *Protein kinase Ciota activity is necessary for Bcr-Abl-mediated resistance to drug-induced apoptosis*. J Biol Chem, 1999. **274**(7): p. 3927-30.
469. Newton, A.C., *Protein kinase C: structural and spatial regulation by phosphorylation, cofactors, and macromolecular interactions*. Chem Rev, 2001. **101**(8): p. 2353-64.
470. Nakanishi, H., K.A. Brewer, and J.H. Exton, *Activation of the zeta isozyme of protein kinase C by phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate*. J Biol Chem, 1993. **268**(1): p. 13-6.
471. Limatola, C., D. Schaap, W.H. Moolenaar, and W.J. van Blitterswijk, *Phosphatidic acid activation of protein kinase C-zeta overexpressed in COS cells: comparison with other protein kinase C isotypes and other acidic lipids*. Biochem J, 1994. **304** ( Pt 3): p. 1001-8.
472. Muller, G., M. Ayoub, P. Storz, J. Rennecke, D. Fabbro, and K. Pfizenmaier, *PKC zeta is a molecular switch in signal transduction of TNF-alpha, bifunctionally regulated by ceramide and arachidonic acid*. Embo J, 1995. **14**(9): p. 1961-9.
473. Balendran, A., G.R. Hare, A. Kieloch, M.R. Williams, and D.R. Alessi, *Further evidence that 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1 (PDK1) is required for the stability and phosphorylation of protein kinase C (PKC) isoforms*. FEBS Lett, 2000. **484**(3): p. 217-23.
474. Hirai, T. and K. Chida, *Protein kinase Czeta (PKCzeta): activation mechanisms and cellular functions*. J Biochem, 2003. **133**(1): p. 1-7.
475. Suzuki, A., T. Yamanaka, T. Hirose, N. Manabe, K. Mizuno, M. Shimizu, K. Akimoto, Y. Izumi, T. Ohnishi, and S. Ohno, *Atypical protein kinase C is involved in the evolutionarily conserved par protein complex and plays a critical role in establishing epithelia-specific junctional structures*. J Cell Biol, 2001. **152**(6): p. 1183-96.
476. Berra, E., M.T. Diaz-Meco, J. Lozano, S. Frutos, M.M. Municio, P. Sanchez, L. Sanz, and J. Moscat, *Evidence for a role of MEK and MAPK during signal transduction by protein kinase C zeta*. EMBO J, 1995. **14**(24): p. 6157-63.
477. Monick, M.M., A.B. Carter, D.M. Flaherty, M.W. Peterson, and G.W. Hunninghake, *Protein kinase C zeta plays a central role in activation of the p42/44 mitogen-activated protein kinase by endotoxin in alveolar macrophages*. J Immunol, 2000. **165**(8): p. 4632-9.
478. Sanz, L., P. Sanchez, M.J. Lallena, M.T. Diaz-Meco, and J. Moscat, *The interaction of p62 with RIP links the atypical PKCs to NF-kappaB activation*. EMBO J, 1999. **18**(11): p. 3044-53.
479. Leitges, M., L. Sanz, P. Martin, A. Duran, U. Braun, J.F. Garcia, F. Camacho, M.T. Diaz-Meco, P.D. Rennert, and J. Moscat, *Targeted disruption of the zetaPKC gene results in the impairment of the NF-kappaB pathway*. Mol Cell, 2001. **8**(4): p. 771-80.
480. Martin, P., A. Duran, S. Minguet, M.L. Gaspar, M.T. Diaz-Meco, P. Rennert, M. Leitges, and J. Moscat, *Role of zeta PKC in B-cell signaling and function*. EMBO J, 2002. **21**(15): p. 4049-57.
481. Romanelli, A., K.A. Martin, A. Toker, and J. Blenis, *p70 S6 kinase is regulated by protein kinase Czeta and participates in a phosphoinositide 3-kinase-regulated signalling complex*. Mol Cell Biol, 1999. **19**(4): p. 2921-8.
482. Romanelli, A., V.C. Dreisbach, and J. Blenis, *Characterization of phosphatidylinositol 3-kinase-dependent phosphorylation of the hydrophobic motif site Thr(389) in p70 S6 kinase 1*. J Biol Chem, 2002. **277**(43): p. 40281-9.

483. Garcia-Cao, I., M.J. Lafuente, L.M. Criado, M.T. Diaz-Meco, M. Serrano, and J. Moscat, *Genetic inactivation of Par4 results in hyperactivation of NF-kappaB and impairment of JNK and p38*. EMBO Rep, 2003. 4(3): p. 307-12.
484. Standaert, M.L., L. Galloway, P. Karnam, G. Bandyopadhyay, J. Moscat, and R.V. Farese, *Protein kinase C-zeta as a downstream effector of phosphatidylinositol 3-kinase during insulin stimulation in rat adipocytes. Potential role in glucose transport*. J Biol Chem, 1997. 272(48): p. 30075-82.
485. Lin, D., A.S. Edwards, J.P. Fawcett, G. Mbamalu, J.D. Scott, and T. Pawson, *A mammalian PAR-3-PAR-6 complex implicated in Cdc42/Rac1 and aPKC signalling and cell polarity*. Nat Cell Biol, 2000. 2(8): p. 540-7.
486. Gao, L., G. Joberty, and I.G. Macara, *Assembly of epithelial tight junctions is negatively regulated by Par6*. Curr Biol, 2002. 12(3): p. 221-5.
487. Sacktor, T.C., P. Osten, H. Valsamis, X. Jiang, M.U. Naik, and E. Sublette, *Persistent activation of the zeta isoform of protein kinase C in the maintenance of long-term potentiation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. 90(18): p. 8342-6.
488. Hrabetova, S. and T.C. Sacktor, *Bidirectional regulation of protein kinase M zeta in the maintenance of long-term potentiation and long-term depression*. J Neurosci, 1996. 16(17): p. 5324-33.
489. Marshall, B.S., G. Price, and C.T. Powell, *Rat protein kinase c zeta gene contains alternative promoters for generation of dual transcripts with 5'-end heterogeneity*. DNA Cell Biol, 2000. 19(12): p. 707-19.
490. Zhou, G., M.L. Seibenhener, and M.W. Wooten, *Nucleolin is a protein kinase C-zeta substrate. Connection between cell surface signaling and nucleus in PC12 cells*. J Biol Chem, 1997. 272(49): p. 31130-7.
491. Mizukami, Y., S. Kobayashi, F. Uberall, K. Hellbert, N. Kobayashi, and K. Yoshida, *Nuclear mitogen-activated protein kinase activation by protein kinase czeta during reoxygenation after ischemic hypoxia*. J Biol Chem, 2000. 275(26): p. 19921-7.
492. Nickerson, J., *Experimental observations of a nuclear matrix*. J Cell Sci, 2001. 114(Pt 3): p. 463-74.
493. Martelli, A.M., E. Falcieri, M. Zweyer, R. Bortul, G. Tabellini, A. Cappellini, L. Cocco, and L. Manzoli, *The controversial nuclear matrix: a balanced point of view*. Histol Histopathol, 2002. 17(4): p. 1193-205.
494. Municio, M.M., J. Lozano, P. Sanchez, J. Moscat, and M.T. Diaz-Meco, *Identification of heterogeneous ribonucleoprotein A1 as a novel substrate for protein kinase C zeta*. J Biol Chem, 1995. 270(26): p. 15884-91.
495. Martelli, A.M., C. Evangelisti, M. Nyakern, and F.A. Manzoli, *Nuclear protein kinase C*. Biochim Biophys Acta, 2006. 1761(5-6): p. 542-51.
496. Perander, M., G. Bjorkoy, and T. Johansen, *Nuclear import and export signals enable rapid nucleocytoplasmic shuttling of the atypical protein kinase C lambda*. J Biol Chem, 2001. 276(16): p. 13015-24.
497. Idris, I., S. Gray, and R. Donnelly, *Protein kinase C activation: isozyme-specific effects on metabolism and cardiovascular complications in diabetes*. Diabetologia, 2001. 44(6): p. 659-73.
498. Hahn, C.G. and E. Friedman, *Abnormalities in protein kinase C signaling and the pathophysiology of bipolar disorder*. Bipolar Disord, 1999. 1(2): p. 81-6.
499. Battaini, F., *Protein kinase C isoforms as therapeutic targets in nervous system disease states*. Pharmacol Res, 2001. 44(5): p. 353-61.

500. Roman, B.B., D.L. Geenen, M. Leitges, and P.M. Buttrick, *PKC-beta is not necessary for cardiac hypertrophy*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2001. **280**(5): p. H2264-70.
501. Kawata, H., K. Yoshida, A. Kawamoto, H. Kurioka, E. Takase, Y. Sasaki, K. Hatanaka, M. Kobayashi, T. Ueyama, T. Hashimoto, and K. Dohi, *Ischemic preconditioning upregulates vascular endothelial growth factor mRNA expression and neovascularization via nuclear translocation of protein kinase C epsilon in the rat ischemic myocardium*. Circ Res, 2001. **88**(7): p. 696-704.
502. Leitges, M., M. Mayr, U. Braun, U. Mayr, C. Li, G. Pfister, N. Ghaffari-Tabrizi, G. Baier, Y. Hu, and Q. Xu, *Exacerbated vein graft arteriosclerosis in protein kinase C $\delta$ -null mice*. J Clin Invest, 2001. **108**(10): p. 1505-12.
503. Castagna, M., Y. Takai, K. Kaibuchi, K. Sano, U. Kikkawa, and Y. Nishizuka, *Direct activation of calcium-activated, phospholipid-dependent protein kinase by tumor-promoting phorbol esters*. J Biol Chem, 1982. **257**(13): p. 7847-51.
504. Housey, G.M., M.D. Johnson, W.L. Hsiao, C.A. O'Brian, J.P. Murphy, P. Kirschmeier, and I.B. Weinstein, *Overproduction of protein kinase C causes disordered growth control in rat fibroblasts*. Cell, 1988. **52**(3): p. 343-54.
505. Persons, D.A., W.O. Wilkison, R.M. Bell, and O.J. Finn, *Altered growth regulation and enhanced tumorigenicity of NIH 3T3 fibroblasts transfected with protein kinase C-I cDNA*. Cell, 1988. **52**(3): p. 447-58.
506. Weinstein, I.B., *Nonmutagenic mechanisms in carcinogenesis: role of protein kinase C in signal transduction and growth control*. Environ Health Perspect, 1991. **93**: p. 175-9.
507. Koivunen, J., V. Aaltonen, and J. Peltonen, *Protein kinase C (PKC) family in cancer progression*. Cancer Lett, 2006. **235**(1): p. 1-10.
508. Koivunen, J., V. Aaltonen, S. Koskela, P. Lehenkari, M. Laato, and J. Peltonen, *Protein kinase C alpha/beta inhibitor Go6976 promotes formation of cell junctions and inhibits invasion of urinary bladder carcinoma cells*. Cancer Res, 2004. **64**(16): p. 5693-701.
509. Podar, K., Y.T. Tai, B.K. Lin, R.P. Narsimhan, M. Sattler, T. Kijima, R. Salgia, D. Gupta, D. Chauhan, and K.C. Anderson, *Vascular endothelial growth factor-induced migration of multiple myeloma cells is associated with beta 1 integrin- and phosphatidylinositol 3-kinase-dependent PKC alpha activation*. J Biol Chem, 2002. **277**(10): p. 7875-81.
510. Murray, N.R., L.A. Davidson, R.S. Chapkin, W. Clay Gustafson, D.G. Schattenberg, and A.P. Fields, *Overexpression of protein kinase C betaII induces colonic hyperproliferation and increased sensitivity to colon carcinogenesis*. J Cell Biol, 1999. **145**(4): p. 699-711.
511. Xia, P., L.P. Aiello, H. Ishii, Z.Y. Jiang, D.J. Park, G.S. Robinson, H. Takagi, W.P. Newsome, M.R. Jirousek, and G.L. King, *Characterization of vascular endothelial growth factor's effect on the activation of protein kinase C, its isoforms, and endothelial cell growth*. J Clin Invest, 1996. **98**(9): p. 2018-26.
512. Kawakami, T., Y. Kawakami, and J. Kitaura, *Protein kinase C beta (PKC beta): normal functions and diseases*. J Biochem, 2002. **132**(5): p. 677-82.
513. Basu, A. and J.S. Cline, *Oncogenic transformation alters cisplatin-induced apoptosis in rat embryo fibroblasts*. Int J Cancer, 1995. **63**(4): p. 597-603.
514. Gubina, E., M.S. Rinaudo, Z. Szallasi, P.M. Blumberg, and R.A. Mufson, *Overexpression of protein kinase C isoform epsilon but not delta in human interleukin-3-dependent cells suppresses apoptosis and induces bcl-2 expression*. Blood, 1998. **91**(3): p. 823-9.
515. Gorin, M.A. and Q. Pan, *Protein kinase C epsilon: an oncogene and emerging tumor biomarker*. Mol Cancer, 2009. **8**: p. 9.

516. Shinohara, H., N. Kayagaki, H. Yagita, N. Oyaizu, M. Ohba, T. Kuroki, and Y. Ikawa, *A protective role of PKCepsilon against TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-induced apoptosis in glioma cells*. Biochem Biophys Res Commun, 2001. **284**(5): p. 1162-7.
517. Knauf, J.A., R. Elisei, D. Mochly-Rosen, T. Liron, X.N. Chen, R. Gonsky, J.R. Korenberg, and J.A. Fagin, *Involvement of protein kinase Cepsilon (PKCepsilon) in thyroid cell death. A truncated chimeric PKCepsilon cloned from a thyroid cancer cell line protects thyroid cells from apoptosis*. J Biol Chem, 1999. **274**(33): p. 23414-25.
518. Akita, Y., *Protein kinase C-epsilon (PKC-epsilon): its unique structure and function*. J Biochem, 2002. **132**(6): p. 847-52.
519. Morse-Gaudio, M., J.M. Connolly, and D.P. Rose, *Protein kinase C and its isoforms in human breast cancer cells: relationship to the invasive phenotype*. Int J Oncol, 1998. **12**(6): p. 1349-54.
520. Song, M.S., Y.K. Park, J.H. Lee, and K. Park, *Induction of glucose-regulated protein 78 by chronic hypoxia in human gastric tumor cells through a protein kinase C-epsilon/ERK/AP-1 signaling cascade*. Cancer Res, 2001. **61**(22): p. 8322-30.
521. Wu, D., T.L. Foreman, C.W. Gregory, M.A. McJilton, G.G. Wescott, O.H. Ford, R.F. Alvey, J.L. Mohler, and D.M. Terrian, *Protein kinase cepsilon has the potential to advance the recurrence of human prostate cancer*. Cancer Res, 2002. **62**(8): p. 2423-9.
522. Hofmann, J., *Protein kinase C isozymes as potential targets for anticancer therapy*. Curr Cancer Drug Targets, 2004. **4**(2): p. 125-46.
523. Slupsky, J.R., A.S. Kamiguti, R.J. Harris, J.C. Cawley, and M. Zuzel, *Central role of protein kinase Cepsilon in constitutive activation of ERK1/2 and Rac1 in the malignant cells of hairy cell leukemia*. Am J Pathol, 2007. **170**(2): p. 745-54.
524. Cacace, A.M., M. Ueffing, A. Philipp, E.K. Han, W. Kolch, and I.B. Weinstein, *PKC epsilon functions as an oncogene by enhancing activation of the Raf kinase*. Oncogene, 1996. **13**(12): p. 2517-26.
525. Cai, H., U. Smola, V. Wixler, I. Eisenmann-Tappe, M.T. Diaz-Meco, J. Moscat, U. Rapp, and G.M. Cooper, *Role of diacylglycerol-regulated protein kinase C isotypes in growth factor activation of the Raf-1 protein kinase*. Mol Cell Biol, 1997. **17**(2): p. 732-41.
526. Sanz-Navares, E., N. Fernandez, M.G. Kazanietz, and S.A. Rotenberg, *Atypical protein kinase Czeta suppresses migration of mouse melanoma cells*. Cell Growth Differ, 2001. **12**(10): p. 517-24.
527. Donson, A.M., A. Banerjee, F. Gamboni-Robertson, J.M. Fleitz, and N.K. Foreman, *Protein kinase C zeta isoform is critical for proliferation in human glioblastoma cell lines*. J Neurooncol, 2000. **47**(2): p. 109-15.
528. Powell, C.T., J.E. Gschwend, W.R. Fair, N.J. Britton, D. Stec, and R. Huryk, *Overexpression of protein kinase C-zeta (PKC-zeta) inhibits invasive and metastatic abilities of Dunning R-3327 MAT-LyLu rat prostate cancer cells*. Cancer Res, 1996. **56**(18): p. 4137-41.
529. Davidson, L.A., C.M. Aymond, Y.H. Jiang, N.D. Turner, J.R. Lupton, and R.S. Chapkin, *Non-invasive detection of fecal protein kinase C betaII and zeta messenger RNA: putative biomarkers for colon cancer*. Carcinogenesis, 1998. **19**(2): p. 253-7.
530. Regala, R.P., C. Weems, L. Jamieson, A. Khoor, E.S. Edell, C.M. Lohse, and A.P. Fields, *Atypical protein kinase C iota is an oncogene in human non-small cell lung cancer*. Cancer Res, 2005. **65**(19): p. 8905-11.

531. Murray, N.R., K.R. Kalari, and A.P. Fields, *Protein kinase Ciota expression and oncogenic signaling mechanisms in cancer*. J Cell Physiol, 2011. **226**(4): p. 879-87.
532. Rademaker-Lakhai, J.M., L.V. Beerepoot, N. Mehra, S.A. Radema, R. van Maanen, J.S. Vermaat, E.O. Witteveen, C.M. Visseren-Grul, L. Musib, N. Enas, G. van Hal, J.H. Beijnen, J.H. Schellens, and E.E. Voest, *Phase I pharmacokinetic and pharmacodynamic study of the oral protein kinase C beta-inhibitor enzastaurin in combination with gemcitabine and cisplatin in patients with advanced cancer*. Clin Cancer Res, 2007. **13**(15 Pt 1): p. 4474-81.
533. Harper, J.W. and S.J. Elledge, *The role of Cdk7 in CAK function, a retro-retrospective*. Genes Dev, 1998. **12**(3): p. 285-9.
534. Kobayashi, H., E. Stewart, R.Y. Poon, and T. Hunt, *Cyclin A and cyclin B dissociate from p34cdc2 with half-times of 4 and 15 h, respectively, regardless of the phase of the cell cycle*. J Biol Chem, 1994. **269**(46): p. 29153-60.
535. Peters, J.M., *The anaphase promoting complex/cyclosome: a machine designed to destroy*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2006. **7**(9): p. 644-56.
536. Nakanishi, M., H. Ando, N. Watanabe, K. Kitamura, K. Ito, H. Okayama, T. Miyamoto, T. Agui, and M. Sasaki, *Identification and characterization of human Wee1B, a new member of the Wee1 family of Cdk-inhibitory kinases*. Genes Cells, 2000. **5**(10): p. 839-47.
537. Squire, C.J., J.M. Dickson, I. Ivanovic, and E.N. Baker, *Structure and inhibition of the human cell cycle checkpoint kinase, Wee1A kinase: an atypical tyrosine kinase with a key role in CDK1 regulation*. Structure, 2005. **13**(4): p. 541-50.
538. Caenepeel, S., G. Charydczak, S. Sudarsanam, T. Hunter, and G. Manning, *The mouse kinome: discovery and comparative genomics of all mouse protein kinases*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(32): p. 11707-12.
539. Malumbres, M. and M. Barbacid, *Mammalian cyclin-dependent kinases*. Trends Biochem Sci, 2005. **30**(11): p. 630-41.
540. Malumbres, M., *Revisiting the "Cdk-centric" view of the mammalian cell cycle*. Cell Cycle, 2005. **4**(2): p. 206-10.
541. Santamaria, D., C. Barriere, A. Cerqueira, S. Hunt, C. Tardy, K. Newton, J.F. Caceres, P. Dubus, M. Malumbres, and M. Barbacid, *Cdk1 is sufficient to drive the mammalian cell cycle*. Nature, 2007. **448**(7155): p. 811-5.
542. Sherr, C.J., *The Pezcoller lecture: cancer cell cycles revisited*. Cancer Res, 2000. **60**(14): p. 3689-95.
543. Sherr, C.J. and J.M. Roberts, *CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression*. Genes Dev, 1999. **13**(12): p. 1501-12.
544. Malumbres, M. and M. Barbacid, *To cycle or not to cycle: a critical decision in cancer*. Nat Rev Cancer, 2001. **1**(3): p. 222-31.
545. Cobrinik, D., *Pocket proteins and cell cycle control*. Oncogene, 2005. **24**(17): p. 2796-809.
546. Ishimi, Y., Y. Komamura-Kohno, H.J. Kwon, K. Yamada, and M. Nakanishi, *Identification of MCM4 as a target of the DNA replication block checkpoint system*. J Biol Chem, 2003. **278**(27): p. 24644-50.
547. Zhu, Y., *A model for CDK2 in maintaining genomic stability*. Cell Cycle, 2004. **3**(11): p. 1358-62.

548. Zhu, Y., Y. Ishimi, M. Tanudji, and E. Lees, *Human CDK2 inhibition modifies the dynamics of chromatin-bound minichromosome maintenance complex and replication protein A*. Cell Cycle, 2005. 4(9): p. 1254-63.
549. Hwang, H.C. and B.E. Clurman, *Cyclin E in normal and neoplastic cell cycles*. Oncogene, 2005. 24(17): p. 2776-86.
550. Ubersax, J.A., E.L. Woodbury, P.N. Quang, M. Paraz, J.D. Blethow, K. Shah, K.M. Shokat, and D.O. Morgan, *Targets of the cyclin-dependent kinase Cdk1*. Nature, 2003. 425(6960): p. 859-64.
551. Harper, J.W., J.L. Burton, and M.J. Solomon, *The anaphase-promoting complex: it's not just for mitosis any more*. Genes Dev, 2002. 16(17): p. 2179-206.
552. Fisher, R.P. and D.O. Morgan, *A novel cyclin associates with MO15/CDK7 to form the CDK-activating kinase*. Cell, 1994. 78(4): p. 713-24.
553. Lolli, G. and L.N. Johnson, *CAK-Cyclin-dependent Activating Kinase: a key kinase in cell cycle control and a target for drugs?* Cell Cycle, 2005. 4(4): p. 572-7.
554. Shiekhattar, R., F. Mermelstein, R.P. Fisher, R. Drapkin, B. Dynlacht, H.C. Wessling, D.O. Morgan, and D. Reinberg, *Cdk-activating kinase complex is a component of human transcription factor TFIIH*. Nature, 1995. 374(6519): p. 283-7.
555. Serizawa, H., T.P. Makela, J.W. Conaway, R.C. Conaway, R.A. Weinberg, and R.A. Young, *Association of Cdk-activating kinase subunits with transcription factor TFIIH*. Nature, 1995. 374(6519): p. 280-2.
556. Bochar, D.A., Z.Q. Pan, R. Knights, R.P. Fisher, A. Shilatifard, and R. Shiekhattar, *Inhibition of transcription by the trimeric cyclin-dependent kinase 7 complex*. J Biol Chem, 1999. 274(19): p. 13162-6.
557. Egly, J.M. and F. Coin, *A history of TFIIH: Two decades of molecular biology on a pivotal transcription/repair factor*. DNA Repair (Amst), 2011. 10(7): p. 714-21.
558. Pinhero, R., P. Liaw, K. Bertens, and K. Yankulov, *Three cyclin-dependent kinases preferentially phosphorylate different parts of the C-terminal domain of the large subunit of RNA polymerase II*. Eur J Biochem, 2004. 271(5): p. 1004-14.
559. Akoulitchev, S., S. Chuikov, and D. Reinberg, *TFIIH is negatively regulated by cdk8-containing mediator complexes*. Nature, 2000. 407(6800): p. 102-6.
560. Kasten, M. and A. Giordano, *Cdk10, a Cdc2-related kinase, associates with the Ets2 transcription factor and modulates its transactivation activity*. Oncogene, 2001. 20(15): p. 1832-8.
561. Hu, D., A. Mayeda, J.H. Trembley, J.M. Lahti, and V.J. Kidd, *CDK11 complexes promote pre-mRNA splicing*. J Biol Chem, 2003. 278(10): p. 8623-9.
562. Loyer, P., J.H. Trembley, R. Katona, V.J. Kidd, and J.M. Lahti, *Role of CDK/cyclin complexes in transcription and RNA splicing*. Cell Signal, 2005. 17(9): p. 1033-51.
563. Lalioti, V., D. Pulido, and I.V. Sandoval, *Cdk5, the multifunctional surveyor*. Cell Cycle, 2010. 9(2): p. 284-311.
564. Lew, J., K. Beaudette, C.M. Litwin, and J.H. Wang, *Purification and characterization of a novel proline-directed protein kinase from bovine brain*. J Biol Chem, 1992. 267(19): p. 13383-90.
565. Meyerson, M., G.H. Enders, C.L. Wu, L.K. Su, C. Gorka, C. Nelson, E. Harlow, and L.H. Tsai, *A family of human cdc2-related protein kinases*. EMBO J, 1992. 11(8): p. 2909-17.
566. Ohshima, T., J.M. Ward, C.G. Huh, G. Longenecker, Veeranna, H.C. Pant, R.O. Brady, L.J. Martin, and A.B. Kulkarni, *Targeted disruption of the cyclin-dependent kinase 5 gene*

- results in abnormal corticogenesis, neuronal pathology and perinatal death.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(20): p. 11173-8.
567. Hellmich, M.R., H.C. Pant, E. Wada, and J.F. Battey, *Neuronal cdc2-like kinase: a cdc2-related protein kinase with predominantly neuronal expression.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. **89**(22): p. 10867-71.
568. Tsai, L.H., T. Takahashi, V.S. Caviness, Jr., and E. Harlow, *Activity and expression pattern of cyclin-dependent kinase 5 in the embryonic mouse nervous system.* Development, 1993. **119**(4): p. 1029-40.
569. Gilmore, E.C., T. Ohshima, A.M. Goffinet, A.B. Kulkarni, and K. Herrup, *Cyclin-dependent kinase 5-deficient mice demonstrate novel developmental arrest in cerebral cortex.* J Neurosci, 1998. **18**(16): p. 6370-7.
570. Ohshima, T., E.C. Gilmore, G. Longenecker, D.M. Jacobowitz, R.O. Brady, K. Herrup, and A.B. Kulkarni, *Migration defects of cdk5(-/-) neurons in the developing cerebellum is cell autonomous.* J Neurosci, 1999. **19**(14): p. 6017-26.
571. Cruz, J.C. and L.H. Tsai, *Cdk5 deregulation in the pathogenesis of Alzheimer's disease.* Trends Mol Med, 2004. **10**(9): p. 452-8.
572. Kesavapany, S., B.S. Li, N. Amin, Y.L. Zheng, P. Grant, and H.C. Pant, *Neuronal cyclin-dependent kinase 5: role in nervous system function and its specific inhibition by the Cdk5 inhibitory peptide.* Biochim Biophys Acta, 2004. **1697**(1-2): p. 143-53.
573. Hawasli, A.H. and J.A. Bibb, *Alternative roles for Cdk5 in learning and synaptic plasticity.* Biotechnol J, 2007. **2**(8): p. 941-8.
574. Lai, K.O. and N.Y. Ip, *Recent advances in understanding the roles of Cdk5 in synaptic plasticity.* Biochim Biophys Acta, 2009. **1792**(8): p. 741-5.
575. Tsai, L.H., I. Delalle, V.S. Caviness, Jr., T. Chae, and E. Harlow, *p35 is a neural-specific regulatory subunit of cyclin-dependent kinase 5.* Nature, 1994. **371**(6496): p. 419-23.
576. Tang, D., J. Yeung, K.Y. Lee, M. Matsushita, H. Matsui, K. Tomizawa, O. Hatase, and J.H. Wang, *An isoform of the neuronal cyclin-dependent kinase 5 (Cdk5) activator.* J Biol Chem, 1995. **270**(45): p. 26897-903.
577. Kusakawa, G., T. Saito, R. Onuki, K. Ishiguro, T. Kishimoto, and S. Hisanaga, *Calpain-dependent proteolytic cleavage of the p35 cyclin-dependent kinase 5 activator to p25.* J Biol Chem, 2000. **275**(22): p. 17166-72.
578. Lee, M.S., Y.T. Kwon, M. Li, J. Peng, R.M. Friedlander, and L.H. Tsai, *Neurotoxicity induces cleavage of p35 to p25 by calpain.* Nature, 2000. **405**(6784): p. 360-4.
579. Patrick, G.N., P. Zhou, Y.T. Kwon, P.M. Howley, and L.H. Tsai, *p35, the neuronal-specific activator of cyclin-dependent kinase 5 (Cdk5) is degraded by the ubiquitin-proteasome pathway.* J Biol Chem, 1998. **273**(37): p. 24057-64.
580. Dhavan, R. and L.H. Tsai, *A decade of CDK5.* Nat Rev Mol Cell Biol, 2001. **2**(10): p. 749-59.
581. Cruz, J.C. and L.H. Tsai, *A Jekyll and Hyde kinase: roles for Cdk5 in brain development and disease.* Curr Opin Neurobiol, 2004. **14**(3): p. 390-4.
582. Lee, K.Y., C.C. Helbing, K.S. Choi, R.N. Johnston, and J.H. Wang, *Neuronal Cdc2-like kinase (Nclk) binds and phosphorylates the retinoblastoma protein.* J Biol Chem, 1997. **272**(9): p. 5622-6.
583. Lee, M.H., M. Nikolic, C.A. Baptista, E. Lai, L.H. Tsai, and J. Massague, *The brain-specific activator p35 allows Cdk5 to escape inhibition by p27kip1 in neurons.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(8): p. 3259-63.

584. Ino, H. and T. Chiba, *Intracellular localization of cyclin-dependent kinase 5 (CDK5) in mouse neuron: CDK5 is located in both nucleus and cytoplasm*. Brain Res, 1996. **732**(1-2): p. 179-85.
585. Zhang, J. and K. Herrup, *Cdk5 and the non-catalytic arrest of the neuronal cell cycle*. Cell Cycle, 2008. **7**(22): p. 3487-90.
586. Wen, Z., Z. Zhong, and J.E. Darnell, Jr., *Maximal activation of transcription by Stat1 and Stat3 requires both tyrosine and serine phosphorylation*. Cell, 1995. **82**(2): p. 241-50.
587. Schuringa, J.J., H. Schepers, E. Vellenga, and W. Kruijer, *Ser727-dependent transcriptional activation by association of p300 with STAT3 upon IL-6 stimulation*. FEBS Lett, 2001. **495**(1-2): p. 71-6.
588. Lalioti, V., D. Pulido, and I.V. Sandoval, *Cdk5, the multifunctional surveyor*. Cell Cycle, 2010. **9**(2): p. 284-311.
589. Tian, B., Q. Yang, and Z. Mao, *Phosphorylation of ATM by Cdk5 mediates DNA damage signalling and regulates neuronal death*. Nat Cell Biol, 2009. **11**(2): p. 211-8.
590. Lee, J.H., H.S. Kim, S.J. Lee, and K.T. Kim, *Stabilization and activation of p53 induced by Cdk5 contributes to neuronal cell death*. J Cell Sci, 2007. **120**(Pt 13): p. 2259-71.
591. Li, Z., G. David, K.W. Hung, R.A. DePinho, A.K. Fu, and N.Y. Ip, *Cdk5/p35 phosphorylates mSds3 and regulates mSds3-mediated repression of transcription*. J Biol Chem, 2004. **279**(52): p. 54438-44.
592. Kim, D., C.L. Frank, M.M. Dobbin, R.K. Tsunemoto, W. Tu, P.L. Peng, J.S. Guan, B.H. Lee, L.Y. Moy, P. Giusti, N. Broodie, R. Mazitschek, I. Delalle, S.J. Haggarty, R.L. Neve, Y. Lu, and L.H. Tsai, *Deregulation of HDAC1 by p25/Cdk5 in neurotoxicity*. Neuron, 2008. **60**(5): p. 803-17.
593. Shapiro, G.I., *Cyclin-dependent kinase pathways as targets for cancer treatment*. J Clin Oncol, 2006. **24**(11): p. 1770-83.
594. Wolfel, T., M. Hauer, J. Schneider, M. Serrano, C. Wolfel, E. Klehmann-Hieb, E. De Plaen, T. Hankeln, K.H. Meyer zum Buschenfelde, and D. Beach, *A p16INK4a-insensitive CDK4 mutant targeted by cytolytic T lymphocytes in a human melanoma*. Science, 1995. **269**(5228): p. 1281-4.
595. Sotillo, R., P. Dubus, J. Martin, E. de la Cueva, S. Ortega, M. Malumbres, and M. Barbacid, *Wide spectrum of tumors in knock-in mice carrying a Cdk4 protein insensitive to INK4 inhibitors*. EMBO J, 2001. **20**(23): p. 6637-47.
596. Sotillo, R., J.F. Garcia, S. Ortega, J. Martin, P. Dubus, M. Barbacid, and M. Malumbres, *Invasive melanoma in Cdk4-targeted mice*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(23): p. 13312-7.
597. Corcoran, M.M., S.J. Mould, J.A. Orchard, R.E. Ibbotson, R.M. Chapman, A.P. Boright, C. Platt, L.C. Tsui, S.W. Scherer, and D.G. Oscier, *Dysregulation of cyclin dependent kinase 6 expression in splenic marginal zone lymphoma through chromosome 7q translocations*. Oncogene, 1999. **18**(46): p. 6271-7.
598. Hayette, S., I. Tigaud, E. Callet-Bauchu, M. Ffrench, S. Gazzo, K. Wahbi, M. Callanan, P. Felman, C. Dumontet, J.P. Magaud, and R. Rimokh, *In B-cell chronic lymphocytic leukemias, 7q21 translocations lead to overexpression of the CDK6 gene*. Blood, 2003. **102**(4): p. 1549-50.
599. Carter, S.L., A.C. Eklund, I.S. Kohane, L.N. Harris, and Z. Szallasi, *A signature of chromosomal instability inferred from gene expression profiles predicts clinical outcome in multiple human cancers*. Nat Genet, 2006. **38**(9): p. 1043-8.

600. Fukasawa, K., *Oncogenes and tumour suppressors take on centrosomes*. Nat Rev Cancer, 2007. 7(12): p. 911-24.
601. Knockaert, M., P. Greengard, and L. Meijer, *Pharmacological inhibitors of cyclin-dependent kinases*. Trends Pharmacol Sci, 2002. 23(9): p. 417-25.
602. Ortega, S., I. Prieto, J. Odajima, A. Martin, P. Dubus, R. Sotillo, J.L. Barbero, M. Malumbres, and M. Barbacid, *Cyclin-dependent kinase 2 is essential for meiosis but not for mitotic cell division in mice*. Nat Genet, 2003. 35(1): p. 25-31.
603. Berthet, C., E. Aleem, V. Coppola, L. Tessarollo, and P. Kaldis, *Cdk2 knockout mice are viable*. Curr Biol, 2003. 13(20): p. 1775-85.
604. Park, K.H., S.E. Choi, M. Eom, and Y. Kang, *Downregulation of the anaphase-promoting complex (APC)7 in invasive ductal carcinomas of the breast and its clinicopathologic relationships*. Breast Cancer Res, 2005. 7(2): p. R238-47.
605. Margot, J.B., A.M. Aguirre-Arteta, B.V. Di Giacco, S. Pradhan, R.J. Roberts, M.C. Cardoso, and H. Leonhardt, *Structure and function of the mouse DNA methyltransferase gene: Dnmt1 shows a tripartite structure*. J Mol Biol, 2000. 297(2): p. 293-300.
606. Pradhan, S. and P.O. Esteve, *Mammalian DNA (cytosine-5) methyltransferases and their expression*. Clin Immunol, 2003. 109(1): p. 6-16.
607. Fersht, A., *Structure and mechanism in protein science: a guide to enzyme catalysis and protein folding*, in 1st ed., U.M. Business, Editor. 1998: New York.
608. Yang, L., D. Doshi, J. Morrow, A. Katchman, X. Chen, and S.O. Marx, *Protein kinase C isoforms differentially phosphorylate Ca(v)1.2 alpha(1c)*. Biochemistry, 2009. 48(28): p. 6674-83.
609. Wang, Q.J., G. Lu, W.A. Schlapkohl, A. Goerke, C. Larsson, H. Mischak, P.M. Blumberg, and J.F. Mushinski, *The V5 domain of protein kinase C plays a critical role in determining the isoform-specific localization, translocation, and biological function of protein kinase C-delta and -epsilon*. Mol Cancer Res, 2004. 2(2): p. 129-40.
610. Wang, Q.J., P. Acs, J. Goodnight, P.M. Blumberg, H. Mischak, and J.F. Mushinski, *The catalytic domain of PKC-epsilon, in reciprocal PKC-delta and -epsilon chimeras, is responsible for conferring tumorigenicity to NIH3T3 cells, whereas both regulatory and catalytic domains of PKC-epsilon contribute to in vitro transformation*. Oncogene, 1998. 16(1): p. 53-60.
611. Acs, P., K. Bogi, P.S. Lorenzo, A.M. Marquez, T. Biro, Z. Szallasi, and P.M. Blumberg, *The catalytic domain of protein kinase C chimeras modulates the affinity and targeting of phorbol ester-induced translocation*. J Biol Chem, 1997. 272(35): p. 22148-53.
612. Acs, P., Q.J. Wang, K. Bogi, A.M. Marquez, P.S. Lorenzo, T. Biro, Z. Szallasi, J.F. Mushinski, and P.M. Blumberg, *Both the catalytic and regulatory domains of protein kinase C chimeras modulate the proliferative properties of NIH 3T3 cells*. J Biol Chem, 1997. 272(45): p. 28793-9.
613. Berezney, R., *Regulating the mammalian genome: the role of nuclear architecture*. Adv Enzyme Regul, 2002. 42: p. 39-52.
614. Toker, A., *Protein Kinase C Protocols : Identifying Protein Kinase C Substrates An Introduction*, ed. A.C.N. Methods in molecular biology. Vol. Volume 233, VI, 247-251. 2003.
615. Pearson, R.B. and B.E. Kemp, *Protein kinase phosphorylation site sequences and consensus specificity motifs: tabulations*. Methods Enzymol, 1991. 200: p. 62-81.

616. Nishikawa, K., A. Toker, F.J. Johannes, Z. Songyang, and L.C. Cantley, *Determination of the specific substrate sequence motifs of protein kinase C isoforms*. J Biol Chem, 1997. 272(2): p. 952-60.
617. Zhao, Y., J. Liu, L. Li, L. Liu, and L. Wu, *Role of Ras/PKCzeta/MEK/ERK1/2 signaling pathway in angiotensin II-induced vascular smooth muscle cell proliferation*. Regul Pept, 2005. 128(1): p. 43-50.
618. Yang, C.S., J.S. Lee, C.H. Song, G.M. Hur, S.J. Lee, S. Tanaka, S. Akira, T.H. Paik, and E.K. Jo, *Protein kinase C zeta plays an essential role for Mycobacterium tuberculosis-induced extracellular signal-regulated kinase 1/2 activation in monocytes/macrophages via Toll-like receptor 2*. Cell Microbiol, 2007. 9(2): p. 382-96.
619. Sarkar, S., A.L. Abujamra, J.E. Loew, L.W. Forman, S.P. Perrine, and D.V. Faller, *Histone Deacetylase Inhibitors Reverse CpG Methylation by Regulating DNMT1 through ERK Signaling*. Anticancer Res, 2011. 31(9): p. 2723-32.
620. Stefanska, B., J. Huang, B. Bhattacharyya, M. Suderman, M. Hallett, Z.G. Han, and M. Szylf, *Definition of the Landscape of Promoter DNA Hypomethylation in Liver Cancer*. Cancer Res, 2011. 71(17): p. 5891-903.
621. Tan, K., K. Kajino, S. Momose, A. Masaoka, K. Sasahara, K. Shiomi, H. Izumi, M. Abe, N. Ohtsuji, T. Wang, O. Hino, and H. Fujii, *Mesothelin (MSLN) promoter is hypomethylated in malignant mesothelioma, but its expression is not associated with methylation status of the promoter*. Hum Pathol, 2010. 41(9): p. 1330-8.
622. Cai, M., J. Tian, G.H. Zhao, W. Luo, and B.R. Zhang, *Study of methylation levels of parkin gene promoter in Parkinson's disease patients*. Int J Neurosci, 2011. 121(9): p. 497-502.
623. Frommer, M., L.E. McDonald, D.S. Millar, C.M. Collis, F. Watt, G.W. Grigg, P.L. Molloy, and C.L. Paul, *A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. 89(5): p. 1827-31.
624. Liu, K., Y.F. Wang, C. Cantemir, and M.T. Muller, *Endogenous assays of DNA methyltransferases: Evidence for differential activities of DNMT1, DNMT2, and DNMT3 in mammalian cells in vivo*. Mol Cell Biol, 2003. 23(8): p. 2709-19.
625. Brown, N.R., M.E. Noble, J.A. Endicott, and L.N. Johnson, *The structural basis for specificity of substrate and recruitment peptides for cyclin-dependent kinases*. Nat Cell Biol, 1999. 1(7): p. 438-43.
626. Holmes, J.K. and M.J. Solomon, *A predictive scale for evaluating cyclin-dependent kinase substrates. A comparison of p34cdc2 and p33cdk2*. J Biol Chem, 1996. 271(41): p. 25240-6.
627. Suryadinata, R., M. Sadowski, and B. Sarcevic, *Control of cell cycle progression by phosphorylation of cyclin-dependent kinase (CDK) substrates*. Biosci Rep, 2010. 30(4): p. 243-55.
628. Adams, P.D., W.R. Sellers, S.K. Sharma, A.D. Wu, C.M. Nalin, and W.G. Kaelin, Jr., *Identification of a cyclin-cdk2 recognition motif present in substrates and p21-like cyclin-dependent kinase inhibitors*. Mol Cell Biol, 1996. 16(12): p. 6623-33.
629. Schulman, B.A., D.L. Lindstrom, and E. Harlow, *Substrate recruitment to cyclin-dependent kinase 2 by a multipurpose docking site on cyclin A*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. 95(18): p. 10453-8.

630. Ohtsubo, M., A.M. Theodoras, J. Schumacher, J.M. Roberts, and M. Pagano, *Human cyclin E, a nuclear protein essential for the G1-to-S phase transition*. Mol Cell Biol, 1995. **15**(5): p. 2612-24.
631. Pines, J. and T. Hunter, *The differential localization of human cyclins A and B is due to a cytoplasmic retention signal in cyclin B*. EMBO J, 1994. **13**(16): p. 3772-81.
632. Pines, J. and T. Hunter, *Human cyclins A and B1 are differentially located in the cell and undergo cell cycle-dependent nuclear transport*. J Cell Biol, 1991. **115**(1): p. 1-17.
633. Pietrzak, M., G. Rempala, P.T. Nelson, J.J. Zheng, and M. Hetman, *Epigenetic silencing of nucleolar rRNA genes in Alzheimer's disease*. PLoS ONE, 2011. **6**(7): p. e22585.
634. Zawia, N.H., D.K. Lahiri, and F. Cardozo-Pelaez, *Epigenetics, oxidative stress, and Alzheimer disease*. Free Radic Biol Med, 2009. **46**(9): p. 1241-9.
635. Qureshi, I.A. and M.F. Mehler, *Advances in epigenetics and epigenomics for neurodegenerative diseases*. Curr Neurol Neurosci Rep, 2011. **11**(5): p. 464-73.
636. Brown, S.E., I.C. Weaver, M.J. Meaney, and M. Szyf, *Regional-specific global cytosine methylation and DNA methyltransferase expression in the adult rat hippocampus*. Neurosci Lett, 2008. **440**(1): p. 49-53.
637. Harbour, J.W., R.X. Luo, A. Dei Santi, A.A. Postigo, and D.C. Dean, *Cdk phosphorylation triggers sequential intramolecular interactions that progressively block Rb functions as cells move through G1*. Cell, 1999. **98**(6): p. 859-69.
638. D'Aiuto, L., M. Marzulli, K.N. Mohan, E. Borowczyk, F. Saporiti, A. Vandemark, and J.R. Chaillet, *Dissection of structure and function of the N-terminal domain of mouse DNMT1 using regional frame-shift mutagenesis*. PLoS ONE, 2010. **5**(3): p. e9831.
639. Huttlin, E.L., M.P. Jedrychowski, J.E. Elias, T. Goswami, R. Rad, S.A. Beausoleil, J. Villen, W. Haas, M.E. Sowa, and S.P. Gygi, *A tissue-specific atlas of mouse protein phosphorylation and expression*. Cell, 2011. **143**(7): p. 1174-89.
640. Ghoshal, K., J. Datta, S. Majumder, S. Bai, H. Kutay, T. Motiwala, and S.T. Jacob, *5-Aza-deoxycytidine induces selective degradation of DNA methyltransferase 1 by a proteasomal pathway that requires the KEN box, bromo-adjacent homology domain, and nuclear localization signal*. Mol Cell Biol, 2005. **25**(11): p. 4727-41.
641. Lim, M.A., C.K. Kikani, M.J. Wick, and L.Q. Dong, *Nuclear translocation of 3'-phosphoinositide-dependent protein kinase 1 (PDK-1): a potential regulatory mechanism for PDK-1 function*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(24): p. 14006-11.
642. Anderson, K.E., J. Coadwell, L.R. Stephens, and P.T. Hawkins, *Translocation of PDK-1 to the plasma membrane is important in allowing PDK-1 to activate protein kinase B*. Curr Biol, 1998. **8**(12): p. 684-91.
643. Currie, R.A., K.S. Walker, A. Gray, M. Deak, A. Casamayor, C.P. Downes, P. Cohen, D.R. Alessi, and J. Lucocq, *Role of phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate in regulating the activity and localization of 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1*. Biochem J, 1999. **337** ( Pt 3): p. 575-83.
644. Pullen, N., P.B. Dennis, M. Andjelkovic, A. Dufner, S.C. Kozma, B.A. Hemmings, and G. Thomas, *Phosphorylation and activation of p70s6k by PDK1*. Science, 1998. **279**(5351): p. 707-10.
645. Casamayor, A., N.A. Morrice, and D.R. Alessi, *Phosphorylation of Ser-241 is essential for the activity of 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1: identification of five sites of phosphorylation in vivo*. Biochem J, 1999. **342** ( Pt 2): p. 287-92.
646. Moorhead, G.B., L. Trinkle-Mulcahy, and A. Ulke-Lemee, *Emerging roles of nuclear protein phosphatases*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2007. **8**(3): p. 234-44.

647. Peng, L., Z. Yuan, H. Ling, K. Fukasawa, K. Robertson, N. Olashaw, J. Koomen, J. Chen, W.S. Lane, and E. Seto, *SIRT1 Deacetylates the DNA Methyltransferase 1 (DNMT1) Protein and Alters its Activities*. Mol Cell Biol, 2011. **31**(23): p. 4720-34.
648. Baylin, S.B., M. Esteller, M.R. Rountree, K.E. Bachman, K. Schuebel, and J.G. Herman, *Aberrant patterns of DNA methylation, chromatin formation and gene expression in cancer*. Hum Mol Genet, 2001. **10**(7): p. 687-92.

## **ANNEXES**

## **ANNEXE 1**

### **PKC isoforms interact with and phosphorylate DNMT1**

Lavoie, G., Estève, P.-O., Bibens Laulan, N., Pradhan, S. and St-Pierre, Y.

Manuscrit publié dans *BMC Biology*, 2011, May 27 9(1):31.

RESEARCH ARTICLE

Open Access

# PKC isoforms interact with and phosphorylate DNMT1

Geneviève Lavoie<sup>1</sup>, Pierre-Olivier Estève<sup>2</sup>, Nathalie Bibens Laulan<sup>1</sup>, Sriharsa Pradhan<sup>2</sup> and Yves St-Pierre<sup>1\*</sup>

## Abstract

**Background:** DNA methyltransferase 1 (DNMT1) has been shown to be phosphorylated on multiple serine and threonine residues, based on cell type and physiological conditions. Although recent studies have suggested that protein kinase C (PKC) may be involved, the individual contribution of PKC isoforms in their ability to phosphorylate DNMT1 remains unknown. The PKC family consists of at least 12 isoforms that possess distinct differences in structure, substrate requirement, expression and localization.

**Results:** Here we show that PKC $\alpha$ ,  $\beta$ I,  $\beta$ II,  $\delta$ ,  $\gamma$ ,  $\eta$ ,  $\zeta$  and  $\mu$  preferentially phosphorylate the N-terminal domain of human DNMT1. No such phosphorylation of DNMT1 was observed with PKC $\epsilon$ . Using PKC $\zeta$  as a prototype model, we also found that PKC physically interacts with and phosphorylates DNMT1. *In vitro* phosphorylation assays conducted with recombinant fragments of DNMT1 showed that PKC $\zeta$  preferentially phosphorylated the N-terminal region of DNMT1. The interaction of PKC $\zeta$  with DNMT1 was confirmed by GST pull-down and co-immunoprecipitation experiments. Co-localization experiments by fluorescent microscopy further showed that endogenous PKC $\zeta$  and DNMT1 were present in the same molecular complex. Endogenous PKC $\zeta$  activity was also detected when DNMT1 was immunoprecipitated from HEK-293 cells. Overexpression of both PKC $\zeta$  and DNMT1 in HEK-293 cells, but not of either alone, reduced the methylation status of genes distributed across the genome. Moreover, *in vitro* phosphorylation of DNMT1 by PKC $\zeta$  reduced its methyltransferase activity.

**Conclusions:** Our results indicate that phosphorylation of human DNMT1 by PKC is isoform-specific and provides the first evidence of cooperation between PKC $\zeta$  and DNMT1 in the control of the DNA methylation patterns of the genome.

## Background

DNA methylation plays a critical role in a large variety of cellular processes by controlling gene transcription via gene silencing. Methylation in most animals occurs at the level of cytosines within the sequence CpG, although low levels of non-CpG methylation have been reported in some species. In mammals, there are two classes of DNA (cytosine-5) methyltransferases, *de novo* and maintenance methyltransferases. The *de novo* methyltransferase in mammals has two isoforms, DNMT3a and DNMT3b [1]. The maintenance methyltransferase, DNMT1, is the most prevalent DNA methyltransferase found in cells. DNMT1 has several isoforms, including an oocyte-specific isoform that lacks the first 118 amino acids [2] and a splice

variant known as DNMT1b [3]. Maintenance methylation ensures the propagation of tissue-specific methylation patterns established during mammalian development. While the DNMT1 enzymes have a preference for hemimethylated DNA [4], DNMT3a and DNMT3b act on either hemimethylated or unmethylated DNA. Thus, the pattern of mammalian methylation is established and maintained by a set of at least three different DNA methyltransferases.

At present, the signaling cascade by which DNA methylation patterns are imprinted is unclear. Connections between signaling cascades and epigenetic modifications have recently been unraveled by studies showing that the phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/protein kinase B (PKB) signaling pathway regulates the protein level of DNMT1, protecting it from degradation via the ubiquitin-proteasome pathway [5]. The idea that DNMT1 activity could be regulated at the post-translational level

\* Correspondence: yves.st-pierre@iaf.inrs.ca

<sup>1</sup> Institut national de la recherche scientifique, INRS-Institut Armand-Frappier, Laval, QC, Canada

Full list of author information is available at the end of the article

through phosphorylation by a serine/threonine kinase was supported by mass spectrometry studies, which reported phosphorylation sites on the serine and threonine residues located in the N-terminal domain [6-15]. This region of DNMT1 fulfills several regulatory functions by interacting with proteins such as LSH, EZH2, UHRF1, G9a, DMAP1 (DNMT-associated proteins), HDAC2 (a histone deacetylase), HP1 $\beta$ , PCNA, and Rb [16-24]. Recently, Hervouet *et al.* (2010) [25] have demonstrated that the disruption of DNMT1/PCNA/UHRF1 interactions promote a global DNA hypomethylation in human gliomas. They also found that such interactions were regulated by the phosphorylation status of DNMT1 since phosphorylation of human DNMT1 by Akt and PKC, at the specific residues serine-127/143 and serine-127 respectively, correlated with global hypomethylation [25].

The protein kinase C (PKC) family consists of ubiquitously expressed phospholipid-dependent serine/threonine kinases, which regulate a large number of physiological processes, including cell growth and differentiation. Studies on simple organisms have shown that PKC signaling paradigms are conserved through evolution from yeast to humans. This conservation underscores the importance of this family in cellular signaling and provides novel insight into PKC function in complex mammalian systems. PKC isoenzymes with differential cellular distribution, substrate specificities, and activation responsiveness are divided into three groups: the conventional PKC isoforms, which are activated by calcium, diacylglycerol, and phorbol esters (cPKCs;  $\alpha$ ,  $\beta$ I,  $\beta$ II and  $\gamma$ ); the novel PKCs, which are activated by diacylglycerol but are calcium-insensitive (nPKCs;  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\eta$ /L (mouse/human) and  $\theta$ ); and the atypical PKCs, which are calcium- and diacylglycerol-insensitive (aPKCs;  $\zeta$  and  $\lambda$ / $\iota$  (mouse/human)) [26]. Although each PKC isoform regulates a large number of downstream targets, individual members of the PKC family are, however, regulated in different ways, and an increasing number of studies indicates that they have distinct, and often opposing, roles [27-29]. In fact, it is now well accepted that each of the PKC isoforms is unique in its contribution to specific biological processes [30,31]. Whether all PKC isoforms can interact with and phosphorylate DNMT1 remains, however, unknown. Here, we have examined the ability of PKC isoforms to phosphorylate the human DNMT1.

## Results

### In vitro phosphorylation of human DNMT1 by PKC isoforms

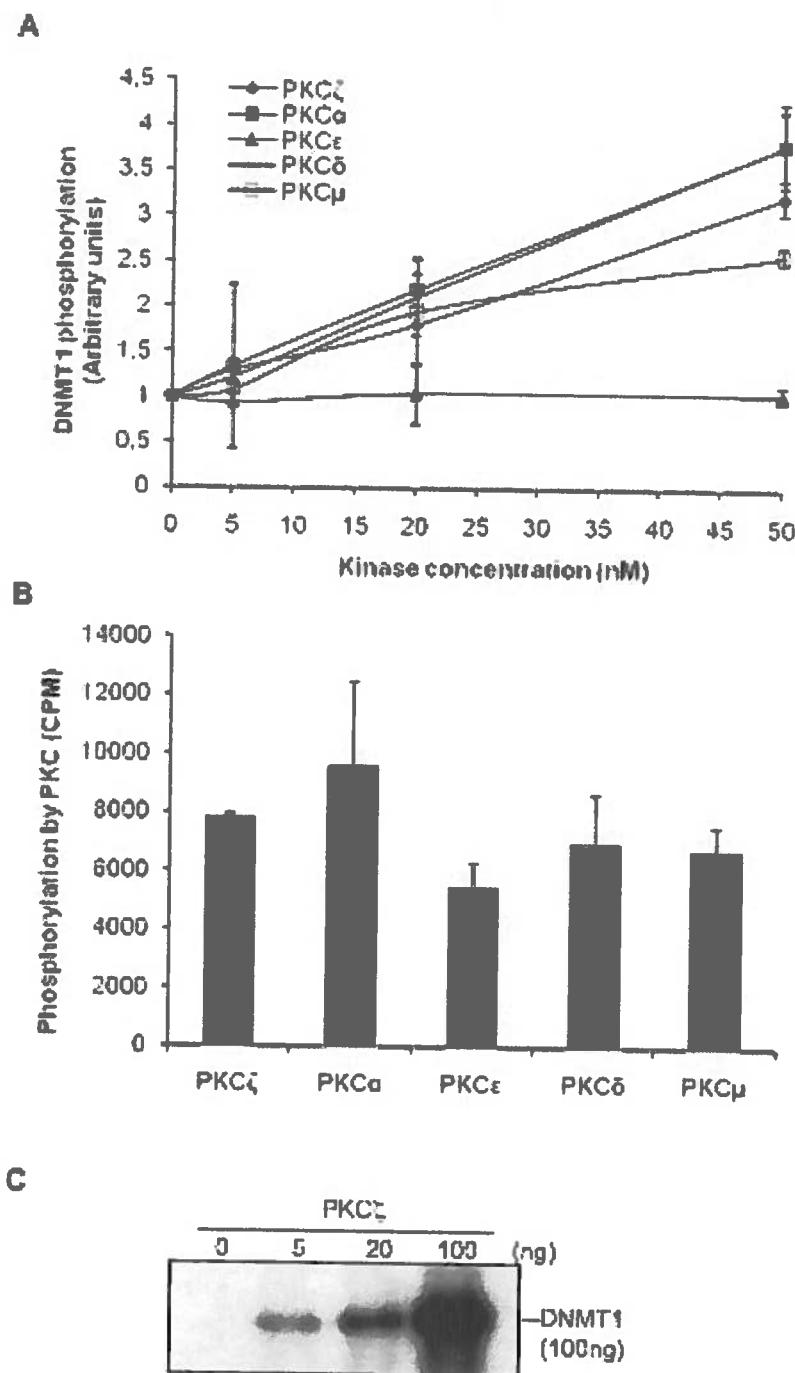
Previous studies have demonstrated that human DNMT1 is phosphorylated on multiple serine and threonine amino acid residues [6-15]. Experiments using broad spectrum of inhibitors have shown that such

phosphorylation on human DNMT1 is dependent on PKC activity [25]. Since PKC family members have contradictory and tissue specific roles, we have compared their ability to phosphorylate human DNMT1. Using an *in vitro* kinase assay, we found that PKC $\alpha$ ,  $\delta$ ,  $\zeta$  and, to a lower extent PKC $\mu$ , were all able to phosphorylate recombinant human DNMT1 in a dose-dependent manner (Figure 1A). No such phosphorylation was observed with PKC $\epsilon$ , although this isoform showed similar activity as compared to other isoforms when tested against a CREB peptide (Figure 1B). Additional evidence of phosphorylation of recombinant full length DNMT1 by a PKC isoform was demonstrated by gel autoradiography using PKC $\zeta$  as a model (Figure 1C).

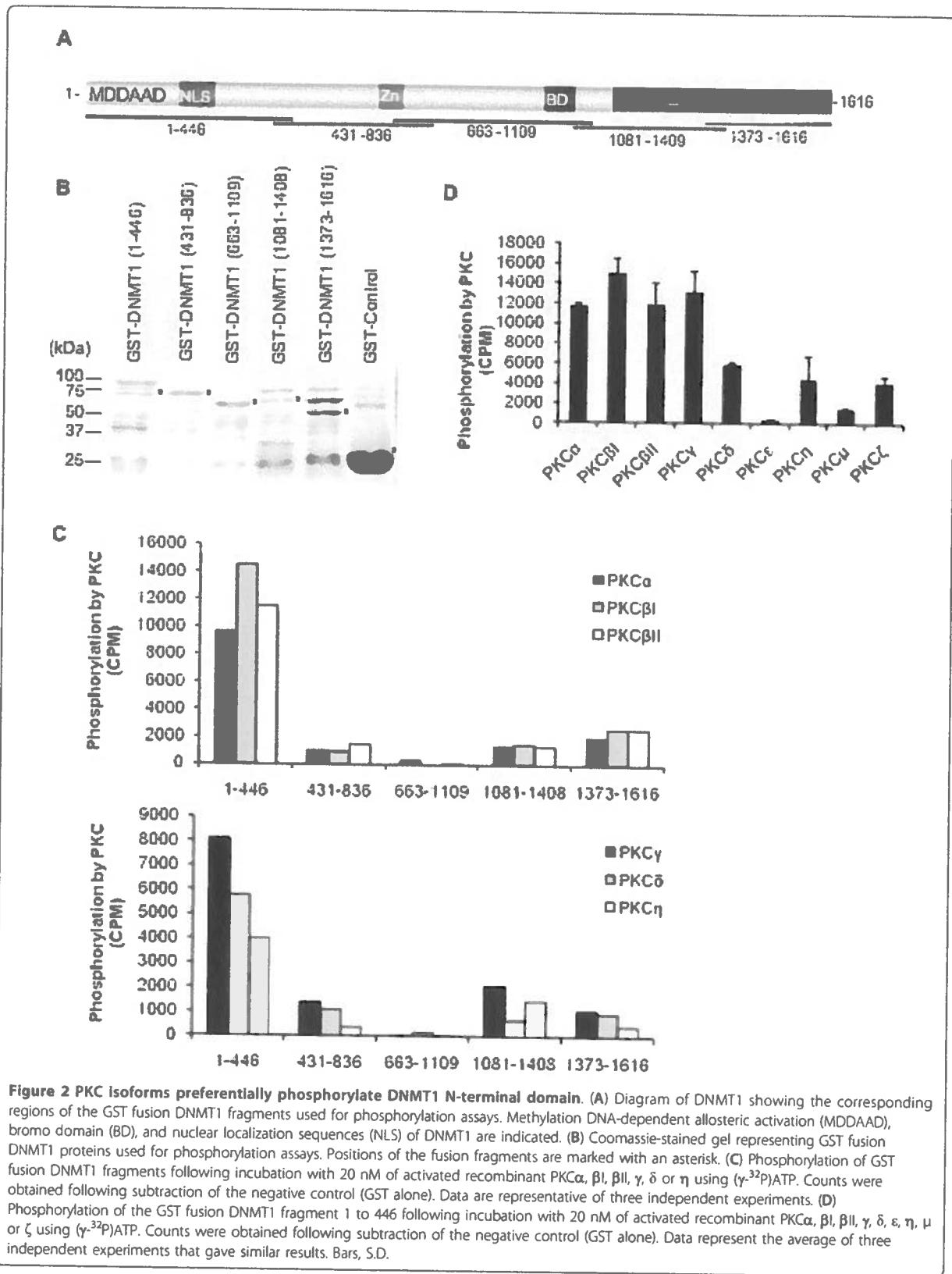
To further compare the ability of PKC isoforms to phosphorylate DNMT1, a series of GST fusions covering the entire length of DNMT1 were challenged with recombinant PKC isoforms (Figure 2A, B). These fragments have previously been used to elucidate specific interaction between DNMT1 and accessory molecules such as hDNMT3a and hDNMT3b [32], p53 [33] and G9a [23]. Our results showed that all PKC isoforms preferentially phosphorylated the N-terminal domain (amino acids 1-446) of DNMT1 (Figure 2C, D). PKC $\epsilon$  was inefficient in its ability to phosphorylate the N-terminal domain (Figure 2D). Such inability of PKC $\epsilon$  to phosphorylate DNMT1 was not restricted to amino acids 1 to 446 since only negligible phosphorylation of other DNMT1 fragments was observed when compared to the ability of other isoforms (Figure 3). These results were consistent with the preferential binding of PKC $\zeta$ , used here as a prototype model, with the N-terminal domain of DNMT1 (Figure 4A, B). A lower but reproducible binding was also observed between PKC $\zeta$  and the C-terminal domains of DNMT1 encompassing amino acids 1081 to 1409 and 1374 to 1616 (Figure 4C, D).

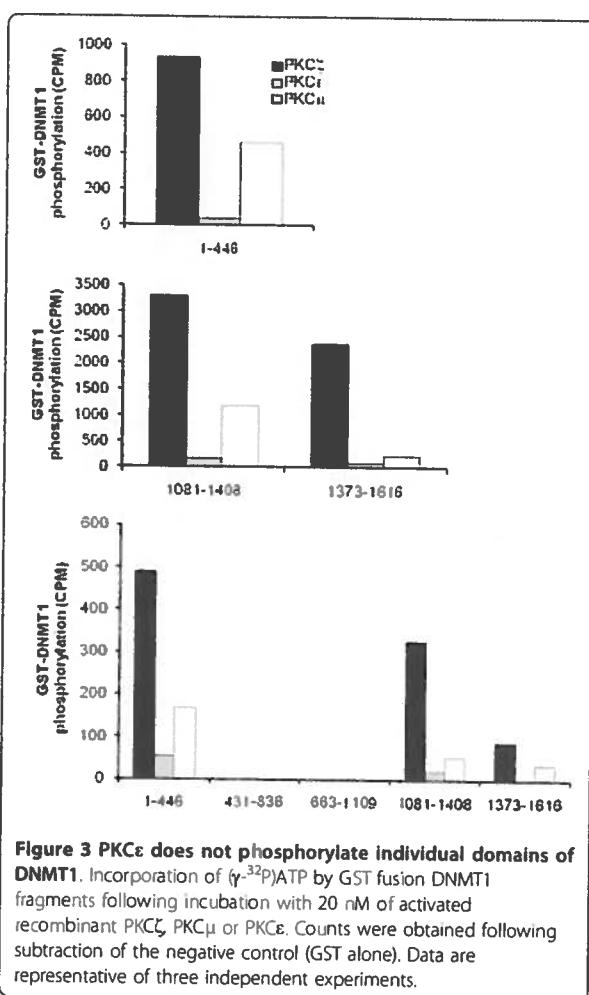
### DNMT1 colocalizes with PKC $\zeta$ in vivo

Colocalization experiments were carried out by fluorescent microscopy in DsRed-DNMT1-transfected HeLa cells, which were stained with an antibody specific for the activated form of endogenous PKC $\zeta$ . Red nuclear spots appeared in all of the transfectants, which was consistent with the localization of DNMT1 in the nucleus (Figure 5B, F). Green nuclear spots identifying the endogenous activated form of PKC $\zeta$  were also visible in the nucleus (Figure 5C, G). Superimposition of GFP and DsRed-DNMT1 signals resulted in yellow nuclear spots, demonstrating colocalization of DNMT1 and PKC $\zeta$  (Figure 5D, H). Further evidence of an *in vivo* physical interaction between DNMT1 and PKC was provided by immunoprecipitates of c-myc-PKC $\zeta$  obtained from nuclear extracts and probed by Western blots with anti-DNMT1 antibody. Physical interaction between



**Figure 1** PKC isoforms phosphorylate human recombinant DNMT1. (A) Quantitative measurements of phosphorylation of 5 nM of DNMT1 in the presence of ( $\gamma$ -<sup>32</sup>P)ATP for 30 minutes at 30°C with the indicated amounts of activated recombinant human PKC $\alpha$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\mu$  or  $\zeta$ . DNMT1 phosphorylation was quantified as the ratio of PKC activity to negative control. Data represent the average of two representative independent experiments. Bars, S.D. (B) PKC activity of recombinant PKC isoforms against CREB, showing that all isoforms were active. 20 nM of each PKC and 1.5  $\mu$ M of CREB peptides were used for the assay and were incubated in the presence of ( $\gamma$ -<sup>32</sup>P)ATP for 30 minutes at 30°C. Bars, S.D. (C) Autoradiography of a SDS-PAGE showing incorporation ( $\gamma$ -<sup>32</sup>P)ATP in recombinant human DNMT1 following incubation with different amounts of human PKC $\zeta$ .





**Figure 3** PKC $\epsilon$  does not phosphorylate individual domains of DNMT1. Incorporation of ( $\gamma$ -<sup>32</sup>P)ATP by GST fusion DNMT1 fragments following incubation with 20 nM of activated recombinant PKC $\zeta$ , PKC $\mu$  or PKC $\epsilon$ . Counts were obtained following subtraction of the negative control (GST alone). Data are representative of three independent experiments.

DNMT1 and PKC $\zeta$  was demonstrated by the presence of DNMT1 in PKC $\zeta$ -c-myc immunoprecipitates (Figure 6A). DNMT1 and PKC $\zeta$  were not detected in control immunoprecipitation experiments using cells transfected with a c-myc expression control vector. Furthermore, endogenous PKC $\zeta$  activity was detected in immunoprecipitates obtained using anti-DNMT1 antibody, but not from immunoprecipitates using an isotypic IgG antibody (Figure 6B). Together, these results confirmed the interaction between DNMT1 and PKC $\zeta$  in HEK-293 cells.

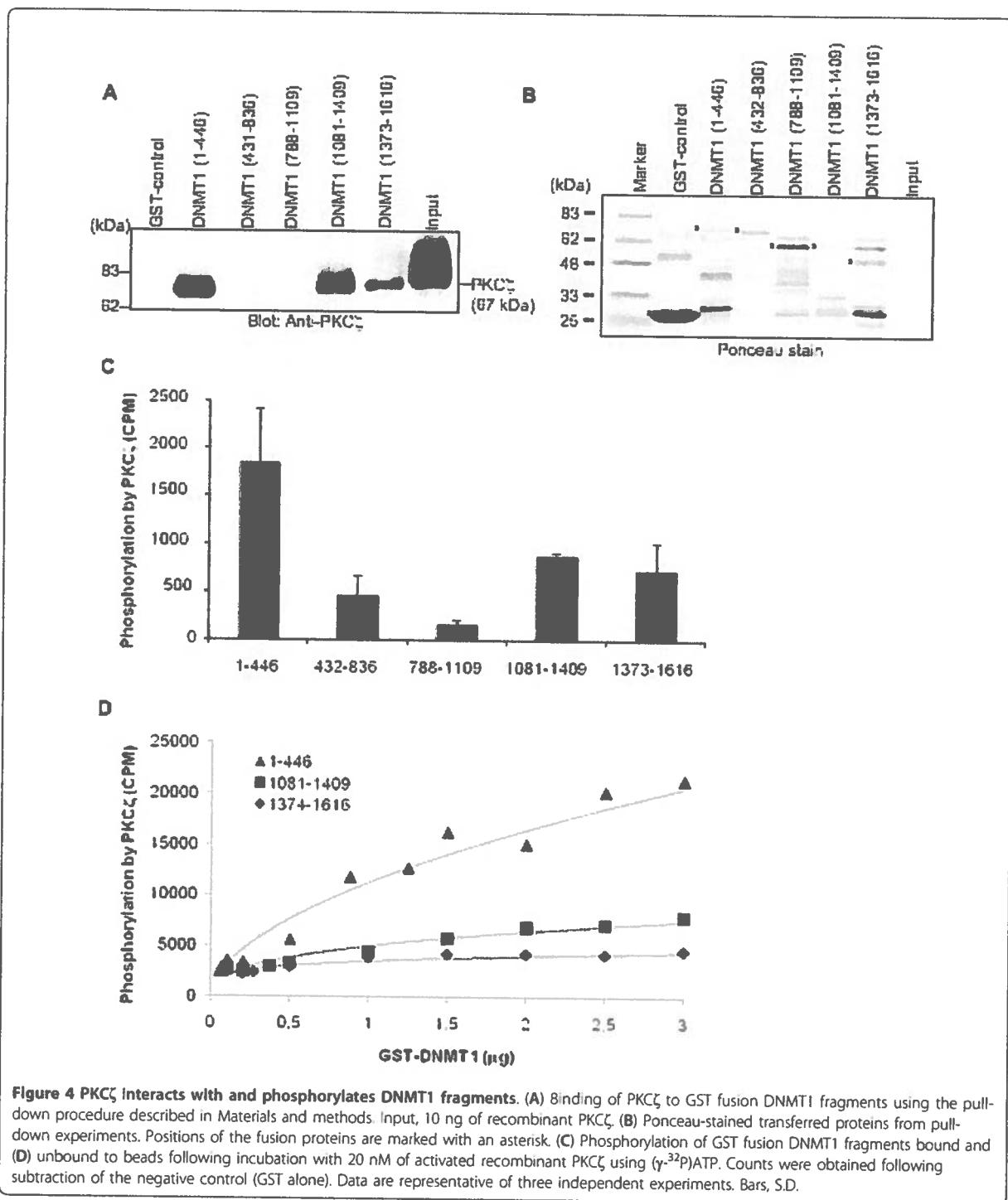
#### Overexpression of PKC $\zeta$ and DNMT1 induces DNA hypomethylation of gene promoters

A recent study has reported that phosphorylation of DNMT1 is associated with a global DNA hypomethylation and a poor prognosis in gliomas [25]. To determine whether interactions between PKC $\zeta$  and DNMT1 could also induce genome-wide changes in other cell types, the DNA methylation status on broad genomic regions were examined in HEK-293 cells overexpressing PKC $\zeta$ .

and/or DNMT1, or control cells, including cells treated with the hypomethylating agent 5-aza-2'-deoxycytidine (5-aza-dC) (Figure 7A). For this purpose, genomic DNA was immunoprecipitated with an antibody against 5-methyl-cytosine and hybridized against Affymetrix Promoter 1.0 Tilling Arrays covering 10 to 12.5 kb regions (2.5 Kb 3' and 7.5 to 10 Kb) of 25,500 human gene promoters, with an average tilling resolution of 35 nucleotides. Analysis of the signals generated by such arrays showed an estimated 2,490 methylated regions in HEK-293 cells. Most of the methylated DNA regions identified corresponded to CpG islands (see Additional File 1). In fact, of the 2,490 methylated regions, 2,089 were in CpG islands. Fifteen regions were selected for quantitative analysis of the methylation status by quantitative PCR (qPCR) based on: 1) their distinct position on the chromosomes, 2) the presence of a CpG island within the active region, and 3) their location upstream of a gene known to be regulated by DNA methylation (although this criteria was not exclusive) (Table 1). Methylated DNA query, using specific primers for each gene showed that most, if not all, of the genes analyzed had a significant reduction in their methylation status in cells overexpressing PKC $\zeta$  and DNMT1, but not in cells overexpressing either PKC $\zeta$  or DNMT1 alone (Figure 7B). This reduction in the methylation status was comparable to that observed in cells treated with the hypomethylating agent 5-aza-dC. This decrease in DNA methylation status was observed on 15 genes dispersed on nine different chromosomes. Moreover, all genes, whether harboring low, medium, or high levels of methylated regions, were susceptible to the overexpression of PKC $\zeta$  and DNMT1. Furthermore, *in vitro* phosphorylation of DNMT1 by PKC $\zeta$  strongly reduced its methyltransferase activity (Figure 8), which was consistent with the decrease in DNA methylation observed in cells overexpressing DNMT1 and PKC $\zeta$ .

#### Discussion

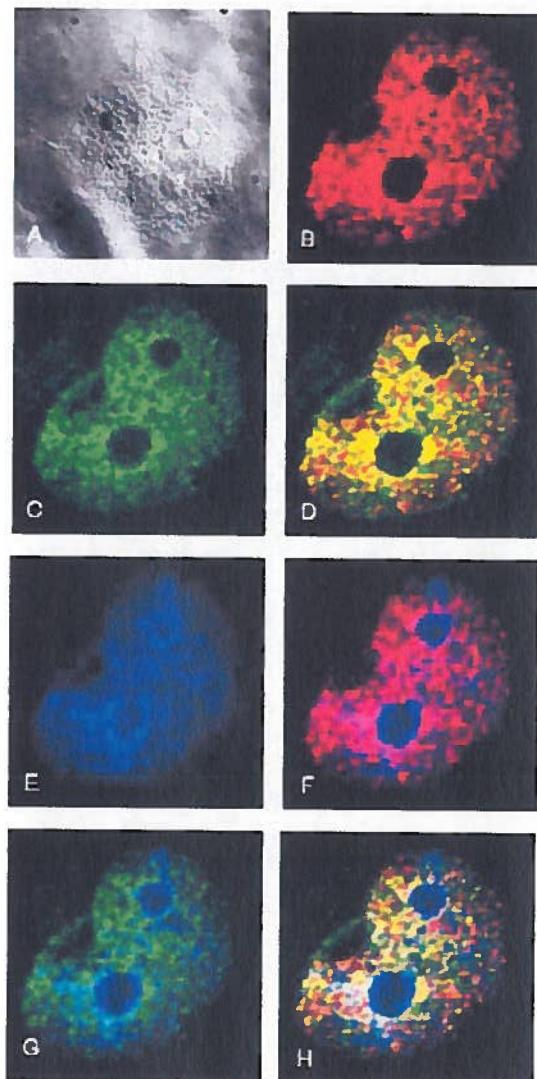
In the present report, we have characterized the relation between PKC isoforms and human DNMT1. More specifically, we found that: 1) PKC $\alpha$ ,  $\beta$ I,  $\beta$ II,  $\delta$ ,  $\gamma$ ,  $\eta$ ,  $\zeta$  and  $\mu$  preferentially phosphorylate the N-terminal domain of human DNMT1; no such phosphorylation was observed with PKC $\epsilon$ ; 2) PKC $\zeta$  and DMNT1 physically interact *in vivo* in the nucleus of HEK-293 and HeLa cells; 3) PKC $\zeta$  activity could be detected in DNMT1 immunoprecipitates of endogenous DNMT1; and 4) overexpression of PKC $\zeta$  and DNMT1 in HEK-293 cells induces a decrease in DNA methylation, consistent with our results showing that phosphorylation of DNMT1 by PKC $\zeta$  reduces its methyltransferase activity. Overall, these results provide novel insights on the ability of PKC isoforms to play a role in controlling DNA methylation.



**Figure 4** PKC $\zeta$  interacts with and phosphorylates DNMT1 fragments. (A) Binding of PKC $\zeta$  to GST fusion DNMT1 fragments using the pull-down procedure described in Materials and methods. Input, 10 ng of recombinant PKC $\zeta$ . (B) Ponceau-stained transferred proteins from pull-down experiments. Positions of the fusion proteins are marked with an asterisk. (C) Phosphorylation of GST fusion DNMT1 fragments bound and unbound to beads following incubation with 20 nM of activated recombinant PKC $\zeta$  using ( $\gamma$ - $^{32}$ P)ATP. Counts were obtained following subtraction of the negative control (GST alone). Data are representative of three independent experiments. Bars, S.D.

In a recent study, the use of broad spectrum inhibitors have suggested that phosphorylation of DNMT1 likely involves Akt and PKC [25]. Here, we provide additional evidence that PKC and DNMT1 physically interact and regulate DNA methylation. Overall, our experiments have

shown that most PKC isoforms, including PKC $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\eta$  and  $\zeta$ , are able to phosphorylate, albeit with different efficiency, the N-terminal region of human DNMT1. In fact, the preferential ability of PKC isoforms to interact with and phosphorylate the region encompassing amino



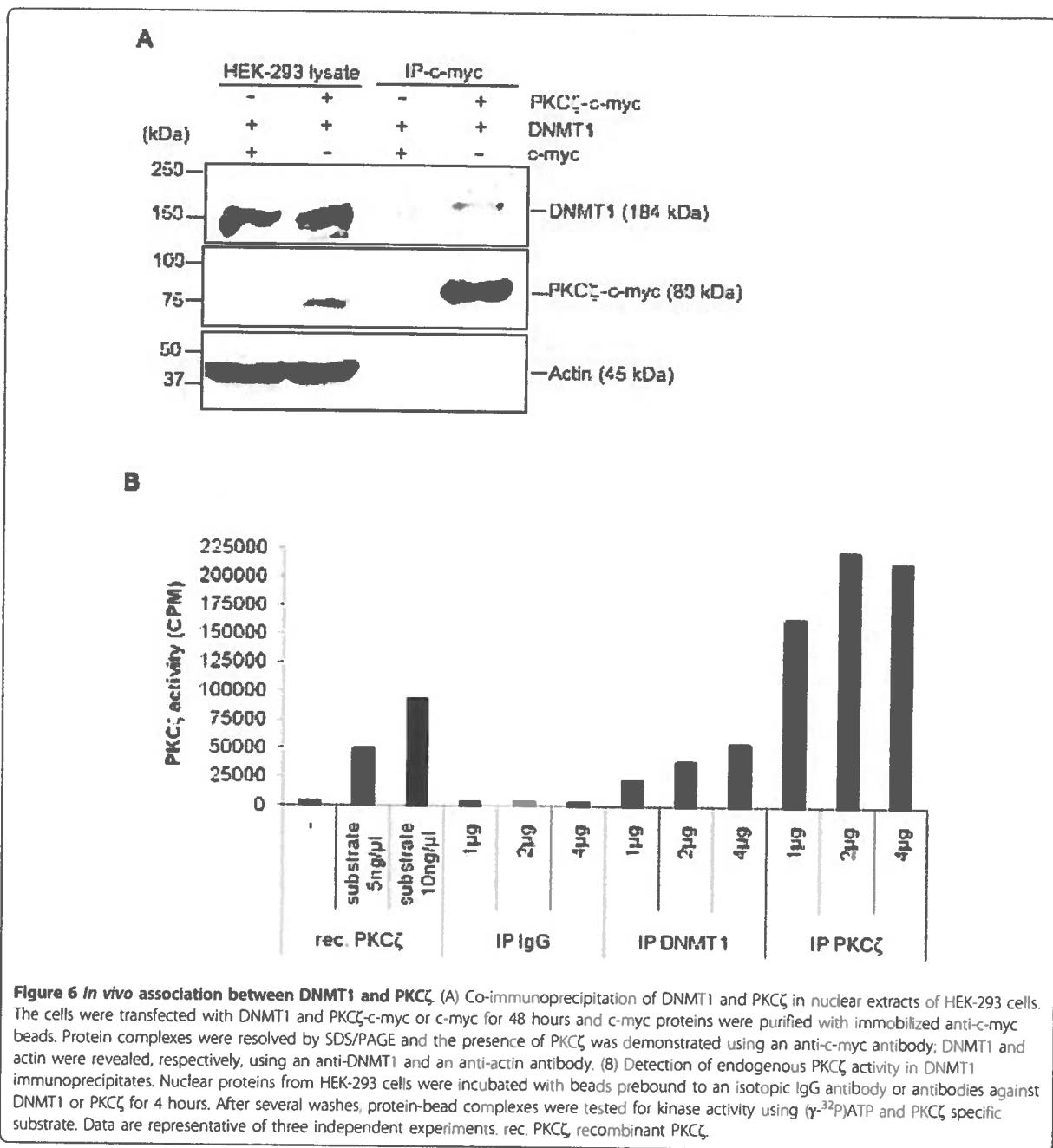
**Figure 5 DNMT1 and PKC $\zeta$  colocalize in the nucleus of HeLa cells.** HeLa cells are shown with (A), DsRed.DNMT1 (red) (B), GFP-phosphorylated-PKC $\zeta$  (green) (C), DsRed.DNMT1 and GFP-phosphorylated-PKC $\zeta$  (merged yellow) (D), nucleus (blue) (E), merge nucleus and DsRed.DNMT1 (F), merge nucleus and GFP-phosphorylated-PKC $\zeta$  (G), merge nucleus, DsRed.DNMT1, and GFP-phosphorylated-PKC $\zeta$  (H). The construct DsRed.DNMT1 was transfected in HeLa cells 48 hours before cells fixation and permeabilization. An anti-phosphorylated-PKC $\zeta$  rabbit antibody was used in combination with an anti-rabbit antibody coupled with GFP to detect endogenous activated form of PKC $\zeta$ .

acids 1 to 446 are consistent with previous results showing preferential phosphorylation of Serine127 [25]. Interestingly, PKC $\epsilon$  and, to a lesser degree PKC $\mu$ , were inefficient in their ability to phosphorylate DNMT1 or its N-terminal domain. Such differential phosphorylation by

PKC has often been observed. For example, phosphorylation of Ser1674 of Ca $v$ 1.2  $\alpha_{1c}$ , but not Ser1928, is PKC isoform specific, as only PKC $\alpha$ ,  $\beta$ I,  $\beta$ II,  $\gamma$ ,  $\delta$  and  $\theta$ , but not PKC $\epsilon$ ,  $\zeta$  and  $\eta$ , phosphorylate this site [34]. Although it is currently unclear why PKC $\epsilon$  is unable to phosphorylate DNMT1, our observations provide an interesting experimental model to investigate further the functional interaction between PKC isoforms and DNMT1.

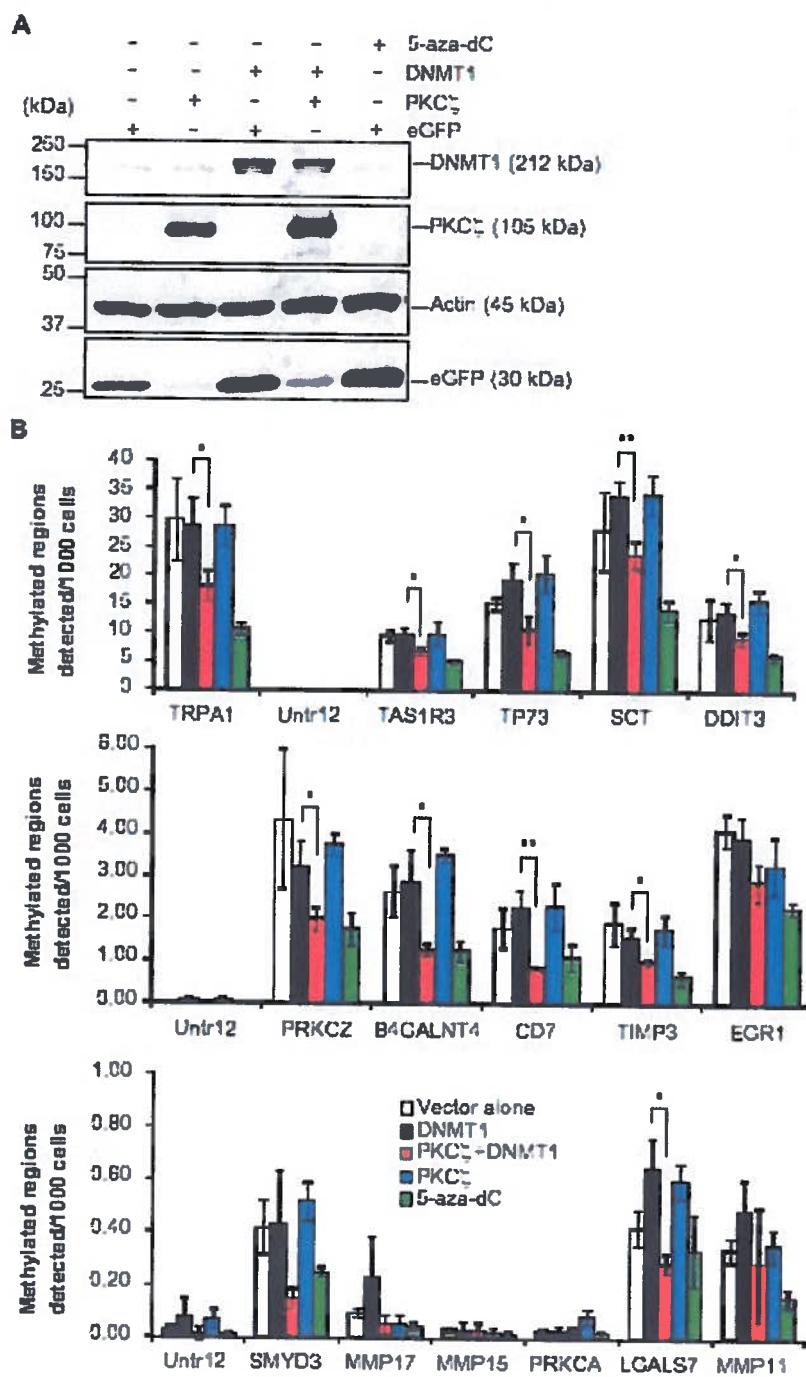
PKC participates in a multitude of cellular processes, including differentiation, proliferation, cell cycle progression and tumorigenesis [30,35]. Increasing evidence has implicated PKC isoforms in nuclear functions, suggesting that they could represent a pathway to communicate to the nucleus signals generated at the plasma membrane [36]. For example, in PC12 cells, PKC $\zeta$  has been found at the inner nuclear matrix of the nucleus [37], where DNA replication gene expression and protein phosphorylation take place [38]. PKC $\zeta$  has also been located in the nucleus of rat H9c2 cells during reoxygenation after ischemic hypoxia [39]. Here we provide further evidence of the presence of activated PKC $\zeta$  in the nucleus of HeLa cells and of HEK-293 cells, indicating that translocation of PKC $\zeta$  into the nucleus is a common mechanism not restricted to a specific cell type. Our attempts to demonstrate an interaction between endogenous DNMT1 and PKC $\zeta$  by co-immunoprecipitation were, however, unsuccessful, most likely due to low expression level of DNMT1. Using a more sensitive approach, we were able to show PKC $\zeta$ -specific activity in immunoprecipitates of endogenous DNMT1, supporting our hypothesis that endogenous DNMT1 and PKC $\zeta$  could be found in the same complex within the nucleus. This hypothesis is also supported by our data showing that flagged DNMT1 interacts with the endogenous form of PKC $\zeta$ . Whether nuclear PKC $\zeta$  stands in close proximity of DNMT1, ready to act in proliferative cells, is not known. This could be, however, a very effective means to rapidly regulate DNMT1 activity when necessary. A similar paradigm has recently been proposed from studies on the regulation of DNMT1 protein stability through the coordinated interaction of an array of DNMT1-associated proteins, such as UHRF1, Tip60 (Tat-interactive protein) and HAUS (herpes virus-associated ubiquitin specific protease) [40-42].

Given its preferential ability to phosphorylate the N-terminal domain of DNMT1, PKC $\zeta$  may contribute to the formation of multimolecular complexes copying the DNA methylation pattern from a parental to a replicated DNA strand. Several proteins have indeed been reported to interact with DNMT1 via its N-terminal domain, including PCNA, which recruits DNMT1 at the mammalian DNA replication forks [20,43-45]. Other proteins, such as HDAC and DMAP1 [21] initiate the



formation of DNA replication complexes at the replication fork to mediate transcriptional repression. DNMT1 has also been associated with methyl-CpG-binding proteins such as MBD2, MBD3 and MeCP2 to maintain DNA methylation [46,47]. Histone methyltransferases and HP1 have been recently found to interact with DNMT1, showing a direct connection between the enzymes responsible for DNA methylation and histone methylation [23,24,48]. Furthermore, DNMT1 can

interact with cell cycle regulating proteins such as Rb and p53 [22,33,49]. It is pertinent to note that PKC $\zeta$  has been shown to interact with and to phosphorylate DNA-bound Sp1, thereby causing the release of the repressor p107 on the *Luteinizing Hormone Receptor* gene promoter in TSA-treated MCF-7 cells [50]. Because Sp1 interacts with HDAC1/2/mSin3A on the *Luteinizing Hormone Receptor* gene promoter in both HeLa and MCF-7 cells [51], and HDAC1/2 binds to



**Figure 7 Decrease of DNA methylation in HEK-293 cells overexpressing DNMT1 and PKC $\zeta$ . (A)** Western blot analysis showing expression of PKC $\zeta$  and DNMT1 in HEK-293 transfected cells used in the analysis of methylated DNA Ip-on-Chip described in Materials and methods. **(B)** Histograms representing the methylation status of 15 genes selected from active regions as measured by qPCR using DNA immunoprecipitated with an antibody against 5-methylcytosine. Untr12 was used as a control for a negative region. TRPA1 was used as a positive control. Copy number values were normalized for primer efficiency by dividing by the values obtained using input DNA and the same primer pairs. Error bars represent standard deviations calculated from the triplicate determinations. \*, P < 0.05; \*\*, P < 0.01.

**Table 1 List of identified genes selected among active regions**

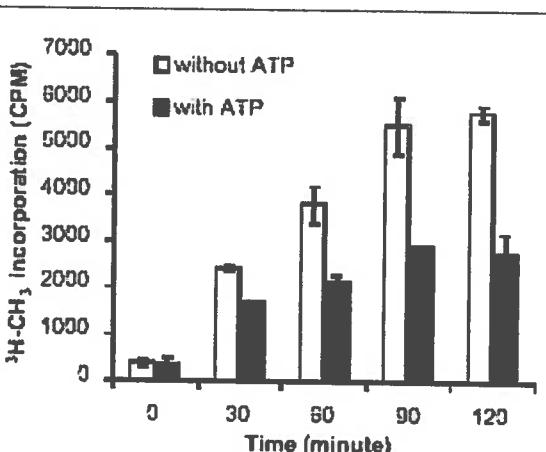
Gene	GeneBank Accession no.	Chr #	Position of active regions	Length (bp)	# of CpG islands	Gene description
TAS1R3	XM_371210	1	1304459 to 1305587	1,128	1	taste receptor, type 1, member 3
PRKCZ	NM_002744	1	2143904 to 2144365	461	0	PKC, zeta
TP73	NM_005427	1	3582480 to 3584936	2,456	1	tumor protein p73
SMYD3	NM_022743	1	242463744 to 242466254	2,510	1	SET and MYND domain containing 3
EGR1	NM_001964	5	137830566 to 137831545	979	1	early growth response 1
TRPA1	NM_007332	8	73149159 to 73150095	936	1	transient receptor potential cation channel, subfamily A, member 1
B4GALNT4	NM_178537	11	352950 to 353975	1,025	0	beta1,4-N-acetylgalactosaminyltransferases IV
SCT	NM_021920	11	617138 to 618042	904	1	secretin
DDIT3	NM_004083	12	56201552 to 56202131	579	0	DNA-damage-inducible transcript 3
MMP17	NM_016155	12	130978656 to 130979436	780	1	matrix metalloproteinase 17
MMP15	NM_002428	16	56617452 to 5661737	285	1	matrix metalloproteinase 15
PRKCA	NM_002737	17	61729105 to 61729712	607	1	PKC, alpha
CD7	NM_006137	17	77870114 to 77871217	1,103	1	CD7 antigen (p41)
LGAL7	NM_002307	19	43973066 to 43974116	1,050	1	Galectin-7
MMP11	NM_005940	22	22439567 to 22439961	394	1	matrix metalloproteinase 11
TIMP3	NM_000362	22	31518100 to 31518635	535	0	tissue inhibitor of metalloproteinase 3

DNMT1 [22], it is thus possible that PKC $\zeta$  could interact with DNMT1 on the promoter via the Sp1/repressor complex. Additional studies will be required to test these possibilities.

Phosphorylation is one of the most common post-translational modifications occurring in animal cells. The previous observations that human DNMT1 was phosphorylated *in vivo* were indicative that at some point, DNMT1 was interacting with yet unidentified serine/threonine kinases. The results from previous mass

spectrometry studies suggested that several phosphorylation sites were targeted depending on the activation status of the cell and/or the cell type [7-15], while Ser154 and Ser714 were shown to be the major phosphorylation sites in HEK-293 cells [8,12], Ser127, Ser143 and Ser714 in Jurkat cells [13] and Ser143 in lung cancer cells [15]. Although it is unclear at present whether distinct phosphorylation sites are targeted by PKC isoforms in different cell types, it is likely that Ser127 is preferentially targeted [25]. Examination of the phosphorylation profile of human DNMT1 reveals, however, the presence of several alternative phosphosites for PKC isoforms, including some located in the C-terminal regions of DNMT1. Future investigations will be necessary to identify the specific phosphorylation sites in different cell types and different states.

We found that the overexpression of PKC $\zeta$  along with DNMT1 in HEK-293 cells led to a decrease in DNA methylation and that phosphorylation of DNMT1 by PKC $\zeta$  reduced its methyltransferase activity *in vitro*. Our preliminary data indicate that these changes in the methylation status may not, however, be sufficient to induce or modulate gene expression. For example, no significant changes in *Egr1* mRNA expression were observed (data not shown). This may not be surprising because DNA hypomethylation of the promoter does not always result in increased gene expression. Moreover, in cancer cells, although gene-specific hypomethylation occurs, much of the effect of global DNA hypomethylation are thought to occur through the activation of the normally dormant transposons and endogenous retroviruses present in the human genome [52]. The fact that overexpression of PKC $\zeta$  alone was not



**Figure 8 Phosphorylation of DNMT1 by PKC $\zeta$  reduces its methyltransferase activity.** Quantitative measurements of S-adenosyl-L-(methyl- $^3$ H)methionine integration in a DNA matrix poly(dI-dC).poly(dI-dC) by 20 nM of recombinant DNMT1 in the presence 100 ng of recombinant PKC $\zeta$  incubated with or without 50  $\mu$ M of ATP for different times. Data are representative of three independent experiments. Bars, S.D.

sufficient to trigger genome hypomethylation may be explained, in part, by the presence of excess of PKC $\zeta$  as compared to endogenous DNMT1. Unbound PKC $\zeta$  might also activate signaling pathways critical for cell proliferation, differentiation and survival, such as the ERK/MAPK pathway, thereby providing a counterbalance to the negative regulation of DNMT1. It is well known that PKC $\zeta$  can activate extracellular signal-regulated kinase/mitogen-activated protein kinase (ERK/MAPK) pathway in different cell types [39,53,54]. Moreover, it has been shown that inhibition of ERK/MAPK pathway lead to a decrease in DNA methylation in colon cancer cells [55].

Our data support the idea that PKC-DNMT1 interaction is important in controlling DNA methylation, possibly by regulating DNMT1 interaction with other proteins, such as UHFR1, as recently suggested [25]. This possibility is also supported by data showing that activation of PKC with phorbol ester in mouse hippocampus tissues induced a rapid demethylation of the *reelin* promoter [56]. To date, it was believed that such a role was essentially mediated through the ability of PKC to down-regulate the DNMT expression at the mRNA level [56]. Moreover, Sun *et al.*, [5] have also shown that treatment of HeLa cells with a specific inhibitor of PI3K, which activates PKC, DNMT1 protein level and genomic content of methylated cytosines were decreased in a time-dependent manner without affecting the DNMT1 mRNA level. Whether phosphorylation of DNMT1 on specific residues was involved in maintaining the functional integrity of the enzyme is in fact a real possibility because mutations of one of the major phosphorylation sites of murine DNMT1, Ser515 (previously referred to as Ser514 by Glickman *et al.*, 1997) [6], has been shown to significantly reduce the *in vitro* enzymatic activity of recombinant DNMT1 [57]. Alternatively, phosphorylation of DNMT1 could affect its structural integrity, thereby reducing its DNA-binding activity, as shown by Sugiyama *et al.* via *in vitro* phosphorylation of murine DNMT1 by CK1 $\delta$  [58]. It would thus be very interesting to determine, for instance, whether phosphorylation of DNMT1 modulates its ability to bind specific endogenous DNA sequences, thereby contributing to the overall genome hypomethylation. Ideally, however, such experiments will require antibodies that recognize specific PKC $\zeta$ -mediated phosphorylated residues on human DNMT1. Future investigations will be needed to address this issue.

## Conclusions

This study is the first to identify PKC specific isoforms involved in the phosphorylation of DNMT1. Indeed, all PKC isoforms except PKC $\epsilon$ , which was very inefficient, preferentially phosphorylated the N-terminal domain

(amino acids 1 to 446) of DNMT1. Functional implications of DNMT1 phosphorylation by PKC isoforms have been highlighted by experiments using PKC $\zeta$  as a model, which suggested possible roles in the control of DNA methylation patterns of the genome, and possibly in the control of gene expression. Based on the importance of PKC signaling in a multitude of biological processes and of a tight regulation of DNA methylation in normal cells, these findings may provide a novel strategy for cancer therapy.

## Methods

### Cell lines, reagents and constructs

The HEK-293 and the human HeLa cell lines were obtained from the American Type Culture Collection (ATCC) and maintained in Dulbecco's modified Eagle complete medium (DMEM) (supplemented with 10% (v/v) FCS, 2 mmol/L L-glutamine, 10 mmol/L HEPES buffer). All cell culture products were obtained from Life Technologies (Burlington, ON, Canada). All other reagents were purchased from Sigma Chemicals (St. Louis, MO), unless otherwise indicated. To generate pEGFP.PKC $\zeta$  and pMACSK $\zeta$ .c-myc.PKC $\zeta$  constructs, the PKC $\zeta$  cDNA (kindly provided by Dr. Alex Toker, Department of Pathology, Harvard Medical School, Boston, MA, USA) was amplified by PCR using primers containing internal restriction sites for EcoRI and KpnI (forward primer: GAATTCATGCCAGCAGGACC-GACC; reverse primer: GGTACCCACACGGACTCCT-CAGC) and XhoI and EcoRI (forward: primer: CTCGGAGATGCCAGCAGGACCGACC; reverse primer: GAATTCCACACGGACTCCTCAGC), respectively. The PCR products were then inserted in PCR4. TOPO (Invitrogen, Burlington, ON, Canada). Following enzymatic digestion with KpnI/EcoRI or XhoI/EcoRI (New England Biolabs, Ipswich, MA), the released fragment (2.12 kb) containing the coding region for PKC $\zeta$  was gel-purified and ligated into pEGFP.N1 (Clontech Laboratories, Mountain View, CA) or pMACSK $\zeta$ .c-myc (C) (Miltenyi Biotec, Auburn, CA). The resulting pEGFP.PKC $\zeta$  and pMACSK $\zeta$ .c-myc.PKC $\zeta$  constructs were validated by sequencing and restriction enzyme analyses, as well as by Western blotting following transient transfection in HEK-293 cells. Anti-DNMT1 was obtained from New England Biolabs and the GFP antibody was obtained from Roche Applied Science (Laval, QC, Canada).

### Protein phosphorylation

GST or the fusion proteins bound to glutathione-Sepharose beads were incubated with 50  $\mu$ M ATP, 1  $\mu$ Ci ( $\gamma$ -<sup>32</sup>P)ATP, kinase buffer (25 mM Tris-HCl (pH 7.5), 5 mM beta-glycerophosphate, 2 mM dithiothreitol (DTT), 0.1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 10 mM MgCl<sub>2</sub>) and 20 nM

recombinant activated PKC ( $\alpha$ ,  $\beta$ I,  $\beta$ II,  $\delta$ ,  $\gamma$ ,  $\eta$ ,  $\mu$ ,  $\zeta$  or  $\epsilon$ ) (Cell Signaling Technology, Beverly, MA) at 37°C for 30 minutes. Beads were washed three times, resuspended in scintillation liquid and the phosphate incorporation was then measured. For phosphorylation assays using recombinant DNMT1 or fusion proteins unbound to glutathione-Sepharose, the reactions were applied on P81 phosphocellulose paper squares (Millipore, Billerica, MA) and washed three times with 0.75% phosphoric acid followed by one wash with acetone. Finally, the paper squares were put in scintillation liquid and the phosphate incorporation was measured. Otherwise, the reactions were stopped with the addition of Laemmli buffer and the samples were boiled at 98°C for five minutes. The reaction products were resolved by SDS-PAGE, and  $^{32}$ P incorporation was analyzed by autoradiography.

#### GST pull-down assay and Western blot analysis

GST fusion DNMT1 and GST control proteins were expressed in *Escherichia coli* BL21 cells, as described previously [9,10]. Briefly, following induction with 0.3 mM of isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactoside (IPTG) overnight at 16°C, GST fusion proteins were purified from bacterial crude cell lysates according to the manufacturer's instructions (Pfizer-Pharmacia, New York, NY). Binding assays were performed by pre-incubating the GST or GST fusion DNMT1 proteins beads with 100  $\mu$ g/ml bovine serum albumin (BSA) in a binding buffer (50 mM Tris pH 7.5, 28  $\mu$ M ZnCl<sub>2</sub>, 1% Triton X-100, 220 mM NaCl, 10% glycerol) at 4°C for one hour. The beads were centrifuged, resuspended in binding buffer and incubated with 10 ng of recombinant PKC $\zeta$  at 4°C for one hour. Beads were then washed three times with binding buffer containing 500 mM NaCl. The beads were mixed with 1X SDS-PAGE sample loading buffer (New England Biolabs) and incubated at 98°C for five minutes. The protein mixtures were separated on a 4 to 20% polyacrylamide gel (ISS miniplus SupraGel). The protein bands were blotted onto a nitrocellulose membrane and probed using a PKC $\zeta$  antibody (Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, USA).

#### DNA methylation assay

DNA methyltransferase assays were carried out at 37°C for the indicated time in duplicate with a total volume of 25  $\mu$ L of reaction mix, as described previously [4]. Briefly, 20 nM of DNMT1 (New England Biolabs) and 100 ng of PKC $\zeta$  were incubated with or without 50  $\mu$ M of ATP in the presence of 5  $\mu$ Ci of *S*-adenosyl-L-(methyl- $^3$ H)methionine (AdoMet) and 50 ng of poly(dI-dC)-poly(dI-dC) in methyltransferase buffer (50 mM Tris-HCL, pH 7.8, 1 mM Na<sub>2</sub>EDTA, pH 8.0, 1 mM DTT, 7  $\mu$ g/ml phenylmethylsulfonyl fluoride, 5% glycerol) supplemented with 5  $\mu$ g of phosphatidylserine

and 5 mM MgCl<sub>2</sub> to allow PKC $\zeta$  activity. The reactions were stopped by transferring the tubes to an ethanol/dry ice bath, spotted on a DE81 membrane (Millipore) and processed as described previously [4].

#### Immunofluorescence analysis

HeLa cells were transfected with 3  $\mu$ g of DsRed-DNMT1 plasmid using Lipofectamine 2000. After 48 hours, the cells were washed with cold PBS and fixed with 4% paraformaldehyde in PBS. The cells were then permeabilized with 0.2% Triton X-100 in PBS. For endogenous phosphorylated-PKC $\zeta$  labeling, the cells were first incubated overnight at 4°C with a blocking solution (BSA 5% in PBS-Tween). Antibody against phosphorylated-PKC $\zeta$  (Cell Signaling Technology, Beverly, MA) was then added and incubated overnight. After several washes with PBS-Tween, the cells were incubated with an anti-rabbit secondary antibody coupled with GFP for 1 hour at room temperature and then with Hoechst 33342. Cells were dried, fixed and visualized with a Zeiss 200 M microscope (Carl Zeiss Microimaging, Thornwood, NY) with a 63x oil objective lens at 488 nm for GFP-phosphorylated-PKC $\zeta$ , 568 nm for DsRed-DNMT1 fusion, and 460 nm for nuclear staining with Hoechst 33342.

#### Co-immunoprecipitation

HEK-293 cells were seeded in 100 mm dish the day before transfection at a density of  $2 \times 10^6$  cells/dish. Cells were transfected with pCDNA4.DNMT1 in combination with pMACSK<sup>k</sup>.c-myc.PKC $\zeta$  or pMACSK<sup>k</sup>.c-myc. After 48 hours, the cells were harvested and nuclear proteins were extracted with the CelLytic NUCLEAR extraction kit. Equal amounts of nuclear lysates (500  $\mu$ g) (as determined by the Bradford protein assay) and the Profound c-myc tag co-IP kit (Pierce, Rockford, IL) were used to purify c-myc-tagged PKC $\zeta$ , following the manufacturer's instructions. Briefly, nuclear protein extracts were incubated with 10  $\mu$ l of immobilized anti-c-myc beads with end-over-end mixing for two hours at 4°C. Complexes were washed with TBS several times and c-myc-tagged proteins were eluted with reducing sample buffer. Western blot analysis was then performed using an anti-c-myc antibody (Miltenyi Biotec) to detect c-myc.PKC $\zeta$ , an anti-DNMT1 antibody to reveal DNMT1 and an anti- $\beta$ -actin to detect the loading control actin.

#### Western blot analysis

Cells were washed with PBS and homogenized on ice in lysis buffer (50 mM Tris pH 7.4, 150 mM NaCl, 25% glycerol, 1% Triton X-100) supplemented with a cocktail of protease inhibitors and fresh PMSF (0.5 mM) and DTT (1 mM). Equal amounts of cell lysates (as

determined by Bio-Rad protein assay) were separated onto an 8% SDS-PAGE gel and transferred onto nitrocellulose membranes (Bio-Rad Laboratories, Mississauga, ON, Canada). The membranes were blocked with 5% milk in PBS/0.05% Tween-20 overnight at 4°C and then probed for two hours at room temperature with primary antibody diluted 1:5000 in PBS/0.05% Tween-20/5% milk. After several washes in PBS/0.05% Tween-20, membranes were probed with a horseradish peroxidase conjugated anti-mouse or anti-rabbit secondary antibody (Amersham Biosciences, Baie d'Urfé, QC, Canada) diluted 1:10,000 in PBS/0.05% Tween-20/5% milk for one hour at room temperature, followed by several washes in PBS/0.05% Tween-20. Detection was performed using the enhanced chemiluminescence method (Amersham Biosciences).

#### Immunoprecipitation and *in vitro* kinase assay

HEK-293 cells were harvested at confluence and nuclear proteins were extracted. Antibodies against DNMT1 or PKC $\zeta$ , or an isotypic IgG antibody, prebound to protein G beads (Invitrogen) were incubated with nuclear proteins in presence of protease inhibitors (at 4°C) on an orbital shaker for four hours. Proteins bound to beads were washed three times with phosphate buffer and resuspended in kinase buffer. The *in vitro* kinase assay was carried out as described earlier.

#### Methylated DNA IP-on-Chip

DNA was isolated by incubating cells overnight at 50°C in SDS/proteinase K digestion buffer. Lysates were sonicated to shear the DNA to an average length of 300 to 500 bp. DNA was extracted with phenol/chloroform followed by ethanol precipitation, and then further treated with RNase and proteinase K and again ethanol-precipitated. Pellets were resuspended and the resulting DNA was quantified on a Nanodrop spectrophotometer. An aliquot of DNA (20  $\mu$ g) was precleared with protein G agarose beads (Invitrogen). Methylated DNA was detected using an antibody against 5-methyl-cytosine (Abcam ab1884, San Diego, CA). After incubation at 4°C overnight, protein G agarose beads were used to isolate the immune complexes. Complexes were washed and eluted from the beads with SDS buffer. Immunoprecipitated DNA was purified by phenol/chloroform extraction and ethanol precipitation. Quantitative PCR (qPCR) reactions were carried out in triplicate on specific genomic regions using SYBR Green Supermix (Bio-Rad). The resulting signals were normalized for primer efficiency by carrying out qPCR for each primer pair using Input DNA. Immunoprecipitated and Input DNAs were amplified using either random priming or whole-genome amplification (WGA). For random priming, a fixed sequence of 17 bases containing 9 random bases at

the 3' end was used in four linear amplification reactions with Sequenase (USB). Following purification, the randomly primed ChIP DNA was amplified for 30 cycles using a fixed sequence primer. For WGA, the GenomePlex WGA Kit (Sigma-Aldrich, St.Louis, MO) was used. The resulting amplified DNA was purified, quantified, and tested by qPCR at the same genomic regions as the original immunoprecipitated DNA to assess the quality of the amplification reactions. The amplified DNA was digested and labeled using the DNA Terminal Labeling Kit (Affymetrix, Fremont, CA), and then hybridized to Affymetrix GeneChip Human Promoter 1.0R arrays at 45°C overnight. Arrays were washed and scanned, and the resulting CEL files were analyzed using the Affymetrix TAS software. Thresholds were set, and the resulting BED files were analyzed using Genpathway IP (San Diego, CA, USA) analysis software, which provides comprehensive information on genomic annotation, peak metrics and sample comparisons for all peaks (intervals).

#### Methylated DNA Query

Immunoprecipitated DNA was quantified at specific regions using qPCR as described above. Experimental  $C_t$  values were converted to copy numbers detected by comparison with a DNA standard curve run on the same PCR plates. Copy number values were then normalized for primer efficiency by dividing by the values obtained using input DNA and the same primer pairs. Error bars represent standard deviations calculated from the triplicate determinations.

#### Statistical analysis

Student's *t* test was used when comparing two means. The level of significance was determined at  $P < 0.05$ .

#### Additional material

**Additional file 1: ChIP-on-Chip results.** This Excel file contains the results of the ChIP-on-chip analysis. The file contains the following three sheets: the *Interval* sheet, which lists genomic segments where signals or *P*-values are above the threshold, the *active regions*, which lists genomic regions containing one or more intervals, and the *gene* sheet, which lists all genes that have intervals within the chosen GeneMargin. Genes can have more than one interval within the GeneMargin. The GeneMargin is the chosen distance upstream and downstream of a gene that determines whether an interval is associated with that gene. GeneMargins are typically set to 10,000 bp, that is, any interval within 10,000 bp upstream or downstream of a gene is counted as being associated with that gene.

#### Abbreviations

ATCC: American Type Culture Collection; 5-aza-dC: 5-aza-2'-deoxycytidine; CK1 $\delta$ : casein kinase 1 $\delta$ ; CREB: cyclic AMP response element-binding protein; DNMT1: DNA methyltransferase 1; DMAP1: DNA methyltransferase 1-associated protein 1; DTT: dithiothreitol; Egr1: early growth response protein

1; ERK: extracellular signal-regulated kinase; EZH2: enhancer of zeste homolog 2; GST: glutathione S-transferase; HAUS: herpes virus-associated ubiquitin specific protease; HDAC1/2: histone deacetylase 1 and 2; HEPES: 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinethanesulfonic acid; HP1: heterochromatin protein 1; IPTG: isopropyl-β-D-thiogalactoside; LSH: lymphoid-specific helicase; MAPK: mitogen-activated protein kinase; MBD: methyl-CpG-binding domain; MeCP2: methyl-CpG-binding protein 2; PCNA: proliferating cell nuclear antigen; PI3K: phosphatidylinositol 3-kinase; PKB: protein kinase B; PKC: protein kinase C; PMSF: phenylmethylsulfonyl fluoride; Rb: Retinoblastoma protein; Sp1: specificity protein 1; Tip60: tat interactive protein-60; TSA: trichostatin A; UHRF1: ubiquitin-like with PHD and ring finger domains 1; WGA: whole-genome amplification.

#### Acknowledgements

The authors thank Dr. Alex Toker for kindly providing vectors, Doris Legault, Diane Tremblay, Mary Harper, and Paul Labhart for their technical support, and Dr. Edouard F. Potworowski for critical reading of the manuscript. This research was supported by a grant from the National Sciences and Engineering Research Council of Canada. GL is supported by a studentship from the Canadian Institute for Health Research of Canada.

#### Author details

<sup>1</sup>Institut national de la recherche scientifique, INRS-Institut Armand-Frappier, Laval, QC, Canada. <sup>2</sup>RNA Biology Division, New England Biolabs, Ipswich, MA, USA.

#### Authors' contributions

GL, POE, SP and YSP designed the research and analysed the data. GL, POE and NBL performed the research. GL and YSP wrote the paper. All authors read and approved the final manuscript.

#### Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Received: 11 May 2011 Accepted: 27 May 2011 Published: 27 May 2011

#### References

- Okano M, Bell DW, Haber DA, Li E: DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for *de novo* methylation and mammalian development. *Cell* 1999, **99**:247-257.
- Mertineit C, Yoder JA, Taketo T, Laird DW, Trasler JM, Bestor TH: Sex-specific exons control DNA methyltransferase in mammalian germ cells. *Development* 1998, **125**:889-897.
- Bonfils C, Beaulieu N, Chan E, Cotton-Montpetit J, MacLeod AR: Characterization of the human DNA methyltransferase splice variant Dnmt1b. *J Biol Chem* 2000, **275**:10754-10760.
- Pradhan S, Bacolla A, Wells RD, Roberts RJ: Recombinant human DNA (cytosine-5) methyltransferase. I. Expression, purification, and comparison of *de novo* and maintenance methylation. *J Biol Chem* 1999, **274**:33002-33010.
- Sun L, Zhao H, Xu Z, Liu Q, Liang Y, Wang L, Cai X, Zhang L, Hu L, Wang G, Zha X: Phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B pathway stabilizes DNA methyltransferase I protein and maintains DNA methylation. *Cell Signal* 2007, **19**:2255-2263.
- Glickman JF, Pavlovich JG, Reich NO: Peptide mapping of the murine DNA methyltransferase reveals a major phosphorylation site and the start of translation. *J Biol Chem* 1997, **272**:17851-17857.
- Beausoleil SA, Jedrychowski M, Schwartz D, Elias JE, Villen J, Li J, Cohn MA, Cantley LC, Gygi SP: Large-scale characterization of HeLa cell nuclear phosphoproteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004, **101**:12130-12135.
- Molina H, Horn DM, Tang N, Mathivanan S, Pandey A: Global proteomic profiling of phosphopeptides using electron transfer dissociation tandem mass spectrometry. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007, **104**:2199-2204.
- Olsen JV, Blagoev B, Gnad F, Macek B, Kumar C, Mortensen P, Mann M: Global, *in vivo*, and site-specific phosphorylation dynamics in signaling networks. *Cell* 2006, **127**:635-648.
- Dephoure N, Zhou C, Villen J, Beausoleil SA, Bakalarski CE, Eledge SJ, Gygi SP: A quantitative atlas of mitotic phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008, **105**:10762-10767.
- Cantin GT, Yi W, Lu B, Park SK, Xu T, Lee JD, Yates JR: Combining protein-based iMAC, peptide-based iMAC, and MudPIT for efficient phosphoproteomic analysis. *J Proteome Res* 2008, **7**:1346-1351.
- Gauci S, Helbig AO, Slijper M, Krijgsveld J, Heck AJ, Mohammed S: Lys-N and trypsin cover complementary parts of the phosphoproteome in a refined SCX-based approach. *Anal Chem* 2009, **81**:4493-4501.
- Mayya V, Lundgren DH, Hwang SI, Rezaul K, Wu L, Eng JK, Rodionov V, Han DK: Quantitative phosphoproteomic analysis of T cell receptor signaling reveals system-wide modulation of protein-protein interactions. *Sci Signal* 2009, **2**:ra6.
- Chen RQ, Yang QK, Lu BW, Yi W, Cantin G, Chen YL, Farnes C, Yates JR, Lee JD: CDC25B mediates rapamycin-induced oncogenic responses in cancer cells. *Cancer Res* 2009, **69**:2663-2668.
- Tsai CF, Wang YT, Chen YR, Lai CY, Lin PY, Pan KT, Chen JY, Khoo KH, Chen YJ: Immobilized metal affinity chromatography revisited: pH/acid control toward high selectivity in phosphoproteomics. *J Proteome Res* 2008, **7**:4058-4069.
- Myant K, Stanchova I: LSH cooperates with DNA methyltransferases to repress transcription. *Mol Cell Biol* 2008, **28**:215-226.
- Bostick M, Kim JK, Esteve PO, Clark A, Pradhan S, Jacobsen SE: UHRF1 plays a role in maintaining DNA methylation in mammalian cells. *Science* 2007, **317**:1760-1764.
- Vire E, Brenner C, Deplus R, Blanchon L, Fraga M, Didelot C, Morey L, Van Eynde A, Bernard D, Vanderwinden JM, Bollen M, Esteller M, Di Croce L, de Launoit Y, Fuks F: The Polycomb group protein EZH2 directly controls DNA methylation. *Nature* 2006, **439**:871-874.
- Sharif J, Muto M, Takebayashi S, Suetake I, Iwamatsu A, Endo TA, Shinga J, Mizutani-Koseki Y, Toyoda T, Okamura K, Tajima S, Mitsuya K, Okano M, Koseki H: The SRA protein Np95 mediates epigenetic inheritance by recruiting Dnmt1 to methylated DNA. *Nature* 2007, **450**:908-912.
- Chuang LS, Ian HI, Koh TW, Ng HH, Xu G, Li BF: Human DNA-(cytosine-5) methyltransferase-PCNA complex as a target for p21WAF1. *Science* 1997, **277**:1996-2000.
- Rountree MR, Bachman KE, Baylin SB: DNMT1 binds HDAC2 and a new co-repressor, DMAP1, to form a complex at replication foci. *Nat Genet* 2000, **25**:269-277.
- Robertson KD, Ait-Si-Ali S, Yokochi T, Wade PA, Jones PL, Wolffe AP: DNMT1 forms a complex with Rb, E2F1 and HDAC1 and represses transcription from E2F-responsive promoters. *Nat Genet* 2000, **25**:338-342.
- Esteve PO, Chin HG, Smallwood A, Feehery GR, Gangisetty O, Karpf AR, Carey MF, Pradhan S: Direct interaction between DNMT1 and G9a coordinates DNA and histone methylation during replication. *Genes Dev* 2006, **20**:3089-3103.
- Smallwood A, Esteve PO, Pradhan S, Carey M: Functional cooperation between HP1 and DNMT1 mediates gene silencing. *Genes Dev* 2007, **21**:1169-1178.
- Hervouet E, Lalier L, Debien E, Cheray M, Geariron A, Rogniaux H, Lousouarn D, Martin SA, Vallette FM, Cartron PF: Disruption of Dnmt1/PCNA/UHRF1 interactions promotes tumorigenesis from human and mice glial cells. *PLoS ONE* 5:e11333.
- Jaken S: Protein kinase C Isozymes and substrates. *Curr Opin Cell Biol* 1996, **8**:168-173.
- Mischak H, Goodnight JA, Kolch W, Martiny-Baron G, Schaeftle C, Kazanietz MG, Blumberg PM, Pierce JH, Mushinski JF: Overexpression of protein kinase C-delta and -epsilon in NIH 3T3 cells induces opposite effects on growth, morphology, anchorage dependence, and tumorigenicity. *J Biol Chem* 1993, **268**:6090-6096.
- Chen L, Hahn H, Wu G, Chen CH, Liron T, Schechtman D, Cavallaro G, Banci L, Guo Y, Bolli R, Dom GW, Mochly-Rosen D: Opposing cardioprotective actions and parallel hypertrophic effects of delta PKC and epsilon PKC. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001, **98**:11114-11119.
- Fahrmann M, Kaufhold M, Rieg T, Seidler U: Different actions of protein kinase C isoforms alpha and epsilon on gastric acid secretion. *Br J Pharmacol* 2002, **136**:938-946.
- Dempsey EC, Newton AC, Mochly-Rosen D, Fields AP, Reyland ME, Insel PA, Messing RO: Protein kinase C isozymes and the regulation of diverse cell responses. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2000, **279**:L429-438.
- Steinberg SF: Structural basis of protein kinase C isoform function. *Physiol Rev* 2008, **88**:1341-1378.

32. Kim GD, Ni J, Kelesoglu N, Roberts RJ, Pradhan S: **Co-operation and communication between the human maintenance and de novo DNA (cytosine-5) methyltransferases.** *EMBO J* 2002, **21**:4183-4195.
33. Esteve PO, Chin HG, Pradhan S: **Human maintenance DNA (cytosine-5)-methyltransferase and p53 modulate expression of p53-repressed promoters.** *Proc Natl Acad Sci USA* 2005, **102**:1000-1005.
34. Yang L, Doshi D, Morrow J, Katchman A, Chen X, Marx SO: **Protein kinase C isoforms differentially phosphorylate Ca(v)1.2 alpha(1c).** *Biochemistry* 2009, **48**:6674-6683.
35. Musashi M, Ota S, Shiroshita N: **The role of protein kinase C isoforms in cell proliferation and apoptosis.** *Int J Hematol* 2000, **72**:12-19.
36. Martelli AM, Sang N, Borgatti P, Capitani S, Neri LM: **Multiple biological responses activated by nuclear protein kinase C.** *J Cell Biochem* 1999, **74**:499-521.
37. Zhou G, Seibenbener ML, Wooten MW: **Nucleolin is a protein kinase C-zeta substrate. Connection between cell surface signaling and nucleus in PC12 cells.** *J Biol Chem* 1997, **272**:31130-31137.
38. Berezney R: **Regulating the mammalian genome: the role of nuclear architecture.** *Adv Enzyme Regul* 2002, **42**:39-52.
39. Mizukami Y, Kobayashi S, Überall F, Hellbert K, Kobayashi N, Yoshida K: **Nuclear mitogen-activated protein kinase activation by protein kinase czeta during reoxygenation after ischemic hypoxia.** *J Biol Chem* 2000, **275**:19921-19927.
40. Achour M, Fuhrmann G, Alhosin M, Ronde P, Chataigneau T, Mousli M, Schini-Kerth VB, Bronner C: **UHRF1 recruits the histone acetyltransferase Tip60 and controls its expression and activity.** *Biochem Biophys Res Commun* 2009, **390**:523-528.
41. Du Z, Song J, Wang Y, Zhao Y, Guda K, Yang S, Kao HY, Xu Y, Willis J, Markowitz SD, Sedwick D, Weing RM, Wang Z: **DNMT1 stability is regulated by proteins coordinating deubiquitination and acetylation-driven ubiquitination.** *Sci Signal* 3:ra80.
42. Bronner C: **Control of DNMT1 abundance in epigenetic inheritance by acetylation, ubiquitylation, and the histone code.** *Sci Signal* 4:pe3.
43. Leonhardt H, Page AW, Weier HU, Bestor TH: **A targeting sequence directs DNA methyltransferase to sites of DNA replication in mammalian nuclei.** *Cell* 1992, **71**:865-873.
44. Liu Y, Oakeley EJ, Sun L, Jost JP: **Multiple domains are involved in the targeting of the mouse DNA methyltransferase to the DNA replication foci.** *Nucleic Acids Res* 1998, **26**:1038-1045.
45. Vertino PM, Sekowski JA, Coll JM, Applegren N, Han S, Hickey RJ, Malkas LH: **DNMT1 is a component of a multiprotein DNA replication complex.** *Cell Cycle* 2002, **1**:416-423.
46. Tatematsu KI, Yamazaki T, Ishikawa F: **MBD2-MBD3 complex binds to hemi-methylated DNA and forms a complex containing DNMT1 at the replication foci in late S phase.** *Genes Cells* 2000, **5**:677-688.
47. Kimura H, Shiota K: **Methyl-CpG-binding protein, MeCP2, is a target molecule for maintenance DNA methyltransferase, Dnmt1.** *J Biol Chem* 2003, **278**:4806-4812.
48. Fuks F, Hurd PJ, Deplus R, Kouzarides T: **The DNA methyltransferases associate with HP1 and the SUV39H1 histone methyltransferase.** *Nucleic Acids Res* 2003, **31**:2305-2312.
49. Pradhan S, Kim GD: **The retinoblastoma gene product interacts with maintenance human DNA (cytosine-5) methyltransferase and modulates its activity.** *Embo J* 2002, **21**:779-788.
50. Zhang Y, Liao M, Dufau ML: **Phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase Czeta-induced phosphorylation of Sp1 and p107 repressor release have a critical role in histone deacetylase inhibitor-mediated derepression [corrected] of transcription of the luteinizing hormone receptor gene.** *Mol Cell Biol* 2006, **26**:6748-6761.
51. Liao M, Zhang Y, Dufau ML: **Protein kinase Calpha-induced derepression of the human luteinizing hormone receptor gene transcription through ERK-mediated release of HDAC1/Sin3A repressor complex from Sp1 sites.** *Mol Endocrinol* 2008, **22**:1449-1463.
52. Wilson AS, Power BE, Molloy PL: **DNA hypomethylation and human diseases.** *Biochim Biophys Acta* 2007, **1775**:138-162.
53. Zhao Y, Liu J, Li L, Liu L, Wu L: **Role of Ras/PKCzeta/MEK/ERK1/2 signaling pathway in angiotensin II-induced vascular smooth muscle cell proliferation.** *Regul Pept* 2005, **128**:43-50.
54. Yang CS, Lee JS, Song CH, Hur GM, Lee SJ, Tanaka S, Akira S, Paik TH, Jo EK: **Protein kinase C zeta plays an essential role for Mycobacterium tuberculosis-induced extracellular signal-regulated kinase 1/2 activation in monocytes/macrophages via Toll-like receptor 2.** *Cell Microbiol* 2007, **9**:382-396.
55. Lu R, Wang X, Chen ZF, Sun DF, Tian XQ, Fang JY: **Inhibition of the extracellular signal-regulated kinase/mitogen-activated protein kinase pathway decreases DNA methylation in colon cancer cells.** *J Biol Chem* 2007, **282**:12249-12259.
56. Levenson JM, Roth TL, Lubin FD, Miller CA, Huang IC, Desai P, Malone LM, Sweatt JD: **Evidence that DNA (cytosine-5) methyltransferase regulates synaptic plasticity in the hippocampus.** *J Biol Chem* 2006, **281**:15763-15773.
57. Goyal R, Rather P, Laser H, Gowher H, Jeitsch A: **Phosphorylation of serine-515 activates the Mammalian maintenance methyltransferase Dnmt1.** *Epigenetics* 2007, **2**:155-160.
58. Sugiyama Y, Hatano N, Sueyoshi N, Suetake I, Tajima S, Kinoshita E, Kinoshita-Kikuta E, Koike T, Kameshita I: **The DNA-binding activity of mouse DNA methyltransferase 1 is regulated by phosphorylation with casein kinase 1delta/epsilon.** *Biochem J* 427:489-497.

doi:10.1186/1741-7007-9-31

Cite this article as: Lavoie et al.: PKC isoforms interact with and phosphorylate DNMT1. *BMC Biology* 2011 **9**:31.

Submit your next manuscript to BioMed Central and take full advantage of:

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at  
[www.biomedcentral.com/submit](http://www.biomedcentral.com/submit)



## ANNEXE 2

*Cet article a dû être retiré en raison de restrictions liées au droit d'auteur.*

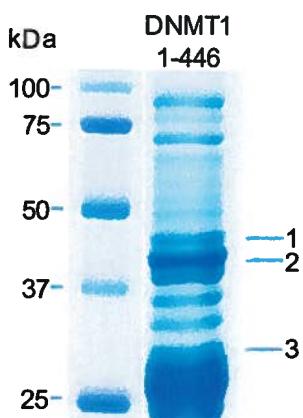
Phosphorylation of human DNMT1: Implication of cyclin-dependent kinases.

Lavoie, G. and St-Pierre, Y.

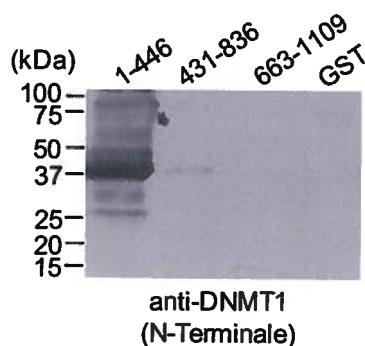
Manuscrit publié dans *Biochemica/ and Biophysica/ Research Communications*, 2011,  
409(2):187-92.

## ANNEXE 3

**A.**



**C.**

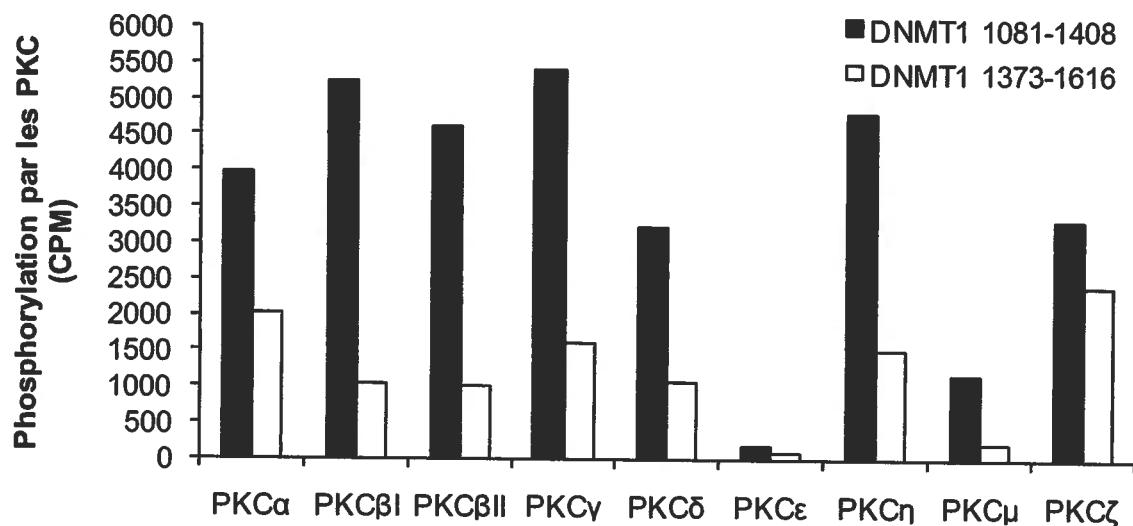


**B.**

Protein Name	Accession	Datasources	Molecular Weight(Da)	Peptide Evidence	Identification Probability	Number of Unique Peptides	Number of Unique Spectra	Number of Total Spectra	Percent of Total Spectra	Percent Sequence Coverage
1 DNMT1_HUMAN DNA (cytosine-5)-methyltransferase P26358 1 OS=Homo sapiens GN=DNMT1 PE=1 S		u_h_sapiens20091124.fasta	183 151	Peptide Evidence	100%	15	23	45	17,1%	9,9%
2 DNMT1_HUMAN DNA (cytosine-5)-methyltransferase P26358 1 OS=Homo sapiens GN=DNMT1 PE=1 S		u_h_sapiens20091124.fasta	183 151	Peptide Evidence	100%	10	16	67	18,2%	6,08%
3 DNMT1_HUMAN DNA (cytosine-5)-methyltransferase P26358 1 OS=Homo sapiens GN=DNMT1 PE=1 S		u_h_sapiens20091124.fasta	183 151	Peptide Evidence	100%	6	8	18	7,41%	3,86%

**Analyse des bandes contaminantes retrouvées dans l'échantillon du fragment protéique de GST-DNMT1 1-446.** **A)** Coloration Coomassie d'un gel représentant le fragment GST-DNMT1 1-446. 1, 2 et 3 correspondent aux bandes qui ont été prélevées et analysées par spectrométrie de masse. **B)** Résultats de la spectrométrie de masse identifiant les bandes 1, 2 et 3 comme des peptides appartenant à la DNMT1 humaine. **C)** Analyse par immunobuvardage de type Western des fragments de DNMT1 correspondant à la portion N-terminale, 1-446, 431-836 et 663-1109, avec l'aide d'un anticorps spécifique reconnaissant la portion N-terminale de DNMT1.

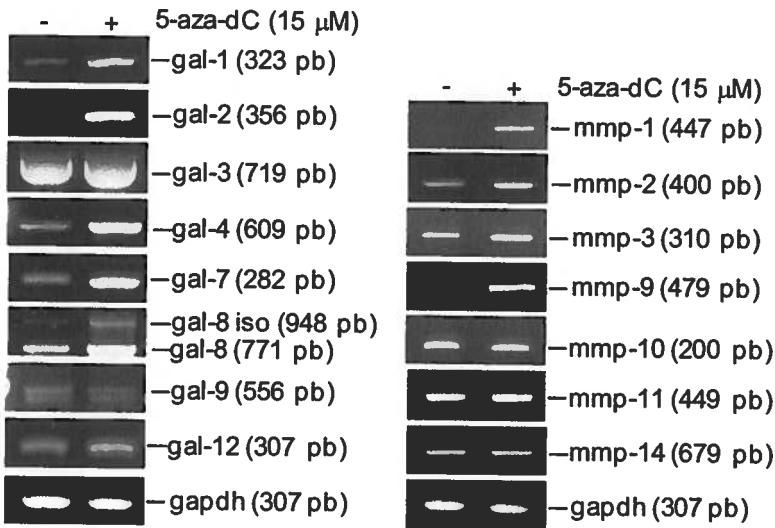
## ANNEXE 4



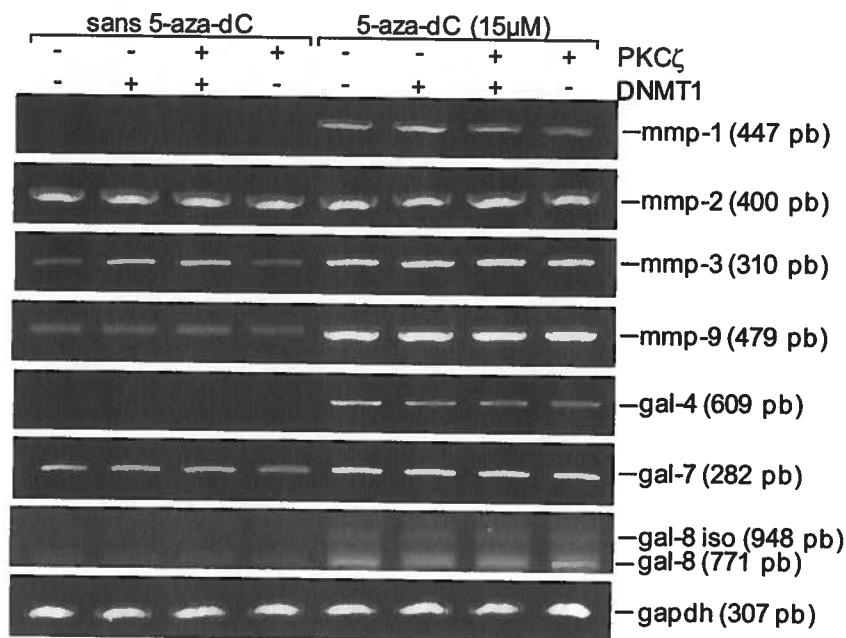
**Phosphorylation du domaine C-terminal de la DNMT1 par divers isoformes de PKC.** Les fragments 1081-1408 et 1373-1616 de DNMT1 fusionnés à la GST ont été mis en présence de 20nM de PKC $\alpha$ ,  $\beta$ I,  $\beta$ II,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\eta$ ,  $\mu$  ou  $\zeta$  recombinantes et de ( $\gamma$ - $^{32}$ P)ATP. Les comptes ont été obtenus par la soustraction du témoin négative GST seul. Les résultats sont représentatifs de deux expériences indépendantes.

## ANNEXE 5

**A.**



**B.**

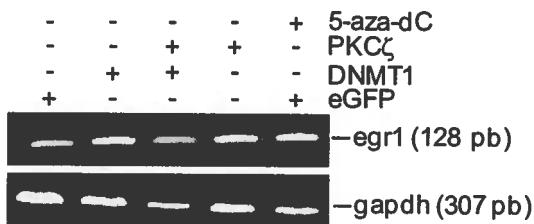


**La surexpression de DNMT1 et PKC $\zeta$  ne semble pas affecter l'expression de plusieurs gènes des familles de Galectines (Gal) et de Métalloprotéases de la matrice (MMP).** A. L'expression de plusieurs gènes des familles de Galectine et de MMP est augmentée suite au

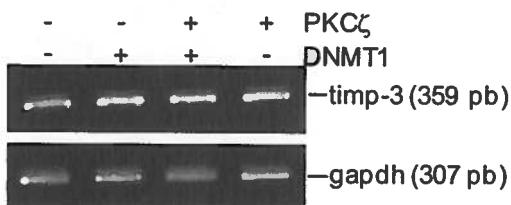
traitement des cellules HEK-293 à la 5-aza-dC. Les cellules HEK-293 ont été traitées pendant 48h avec 15 $\mu$ M de 5-aza-dC et l'analyse de l'expression des gènes identifiés a été effectuée par RT-PCR. **B)** Analyse de l'expression de certains gènes des familles de Galectine et MMP suite à différents traitements. Les cellules HEK-293 ont d'abord été transfectées avec des vecteurs permettant l'expression de DNMT1 ou PKC $\zeta$  et ont ensuite été traitées avec la 5-aza-dC pendant 48h. L'expression des gènes a été analysée par RT-PCR.

## ANNEXE 6

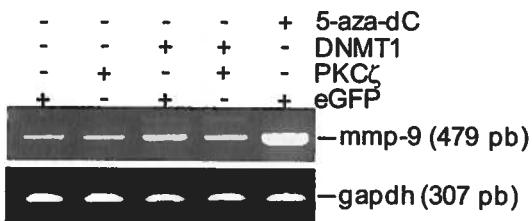
**A.**



**B.**

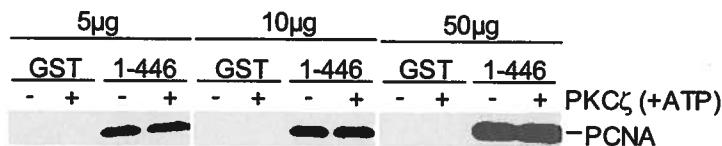


**C.**



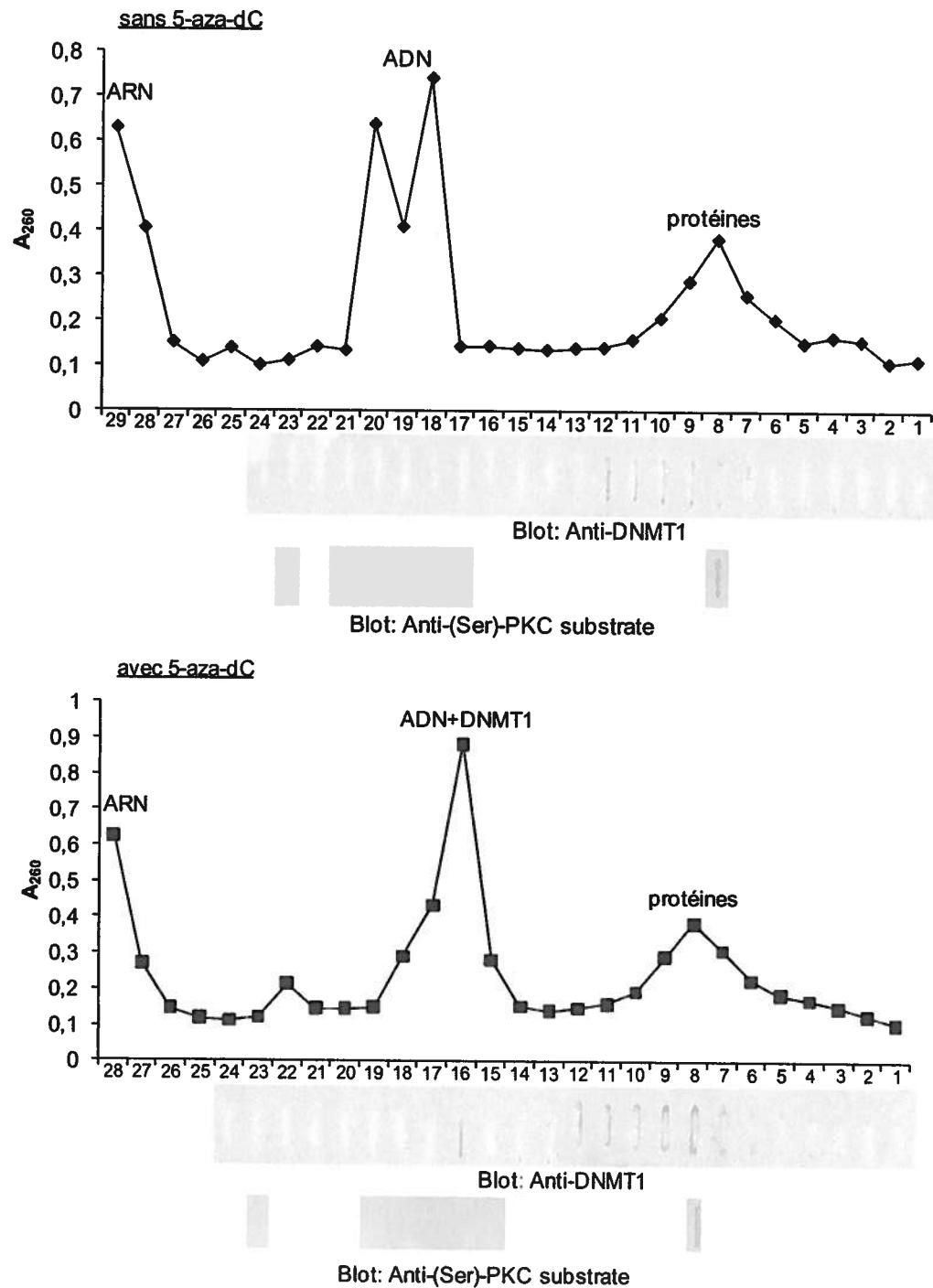
**La surexpression de PKC $\zeta$  et/ou de DNMT1 ne semble pas affecter l'expression des gènes Egr1, Timp-3 et Mmp-9.** Les cellules HEK-293 ont été transfectées avec des vecteurs permettant l'expression de PKC $\zeta$  et de DNMT1 et traitées ou non au 5-aza-dC. L'expression des gènes A) Egr1, B) Timp-3 et C) et Mmp-9 a été analysée par la technique de RT-PCR et visualisée sur gel d'agarose.

## ANNEXE 7



**L'interaction entre DNMT1 et PCNA n'est pas affectée par la phosphorylation de DNMT1 par PKC $\zeta$ .** Différentes quantités d'extraits nucléaires (5, 10 ou 15 $\mu$ g) provenant de cellules HEK-293 ont été mises en présence du fragment GST-DNMT1(1-446) ou la GST seule, phosphorylés préalablement ou non par PKC $\zeta$ , couplés à des billes de Sépharose. Après centrifugation, la présence de PCNA a été analysée par la technique d'immunobuvardage de type Western.

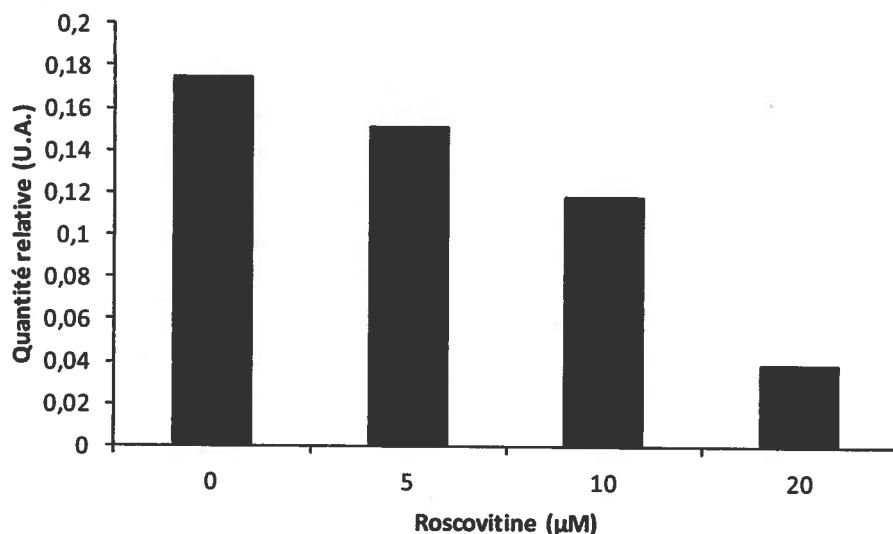
## ANNEXE 8



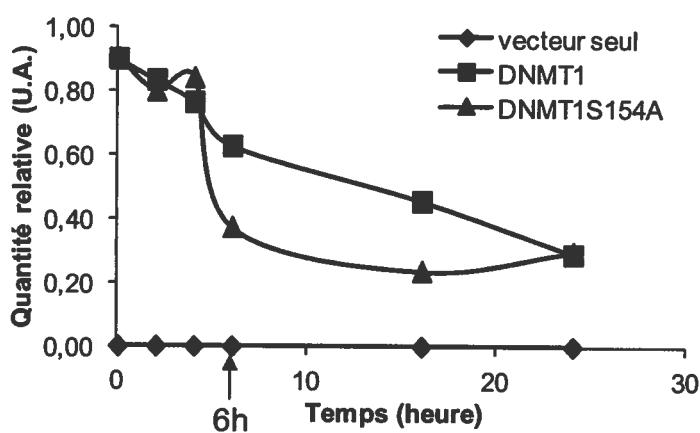
**Analyse ICM de la formation de complexes par DNMT1.** Les cellules HEK-293 ont d'abord été traitées ou non avec la 5-aza-dC pendant 30 minutes. 10µl de chaque fractions, obtenues après la séparation d'un lysat total (lyse par le sarkosyl) sur un gradient de chlorure de césium, ont été analysés par la technique de « Western slot blot ». Le graphique représente le profil de la densité optique de chaque fraction à 260 nm (A260). Le traitement accordé aux cellules est indiqué dans la partie supérieure gauche du graphique et les différentes fractions isolées sont également identifiées.

## ANNEXE 9

**A.**



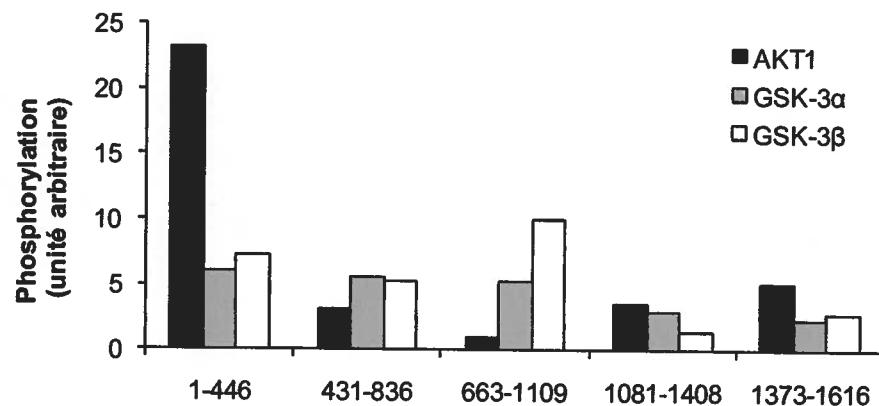
**B.**



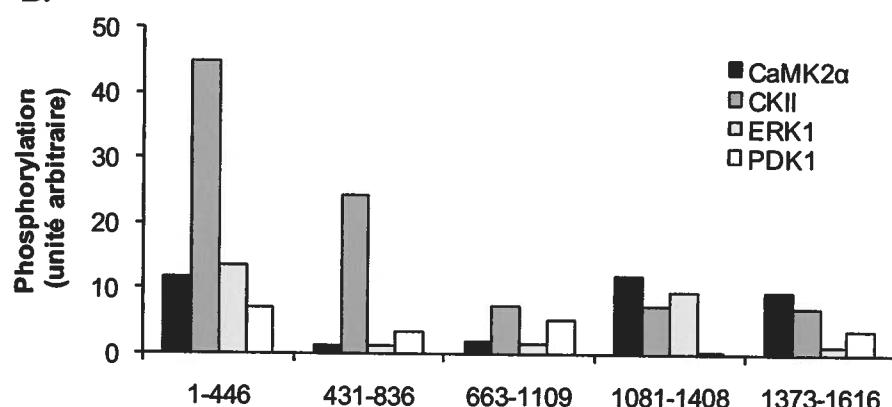
**Quantifications relatives.** A) Quantifications des niveaux de pDNMT1<sup>Ser154</sup> par rapport aux niveaux de DNMT1 totaux de la **Figure 2D, Chapitre III**. B) Quantifications des niveaux de DNMT1 par rapport à l'Actine de la **Figure 4C, Chapitre III**. Les quantifications ont été réalisées par la mesure de la densité des bandes représentées dans l'immunobuvardage de type Western.

## ANNEXE 10

**A.**



**B.**



**Phosphorylation des fragments GST-DNMT1 par diverses sérine/thréonine kinases.** Les fragments 1-446, 431-836, 663-1109, 1081-1408 et 1373-1616 de DNMT1 fusionnés à la GST ont été mis en présence de 20nM de A) AKT1, GSK-3 $\alpha$  ou GSK-3 $\beta$  et B) de CaMK2 $\alpha$ , CKII, ERK1 ou PDK1 recombinantes et de ( $\gamma$ - $^{32}$ P)ATP. La phosphorylation des fragments de DNMT1 a été quantifiée par le ratio de l'activité kinase sur le témoin négatif. Les résultats sont représentatifs de deux expériences indépendantes.

## **ANNEXE 11**

*Cet article a dû être retiré en raison de restrictions liées au droit d'auteur.*

### **Potential directions for drug development against galectin-7 in cancer**

St-Pierre, Y., Biron-Pain, K., Campion, C., Lavoie, G., Bouchard, F. and Couillard, J.

Article publié dans *Expert Opinion Drug Discovery*, 2009 4(6):611-620

Contribution :

Pour cet article de revue scientifique, j'ai participé à l'écriture de la section sur les rôles de la Galectine-7 dans le cancer et créé le tableau I.

## ANNEXE 12

*Cet article a dû être retiré en raison de restrictions liées au droit d'auteur.*

The role of DNA hypomethylation in the control of stromelysin gene expression

Couillard, J., Demers, M., Lavoie, G. and St-Pierre, Y.

Manuscrit publié dans *Biochemical and Biophysica/ Research Communications*, 2006,  
342:1233-1239

Contribution :

Pour cette publication, j'ai réalisé la figure 1, validant le modèle cellulaire de carcinomes du colon humain (HCT116 et DKO) utilisé dans cette étude. J'ai également participé à la correction et la critique de cet article.