



THESE présentée pour obtenir le grade de Docteur de l'Université de Strasbourg

Discipline: Sciences de la vie et de la santé, Aspects moléculaire et cellulaire de la biologie

Présentée par Valérie SCHMUTZ

Réplication de l'ADN endommagé chez les eucaryotes : Régulation et rôle de la mono-ubiquitination de PCNA



Travail réalisé au sein de l'équipe "Mécanismes de tolérance des dommages à l'ADN"

Institut de Recherche de l'École de Biotechnologie de Strasbourg

IREBS, FRE 3211

Soutenue publiquement le 1er juillet 2010

Directeur de Thèse : Agnès CORDONNIER

Rapporteur Externe: Emmanuelle DELAGOUTTE

Rapporteur Externe: Patricia KANNOUCHE

Examineur Interne: Bruno CHATTON

Ce travail de thèse a été réalisé au sein de l'équipe "Mécanisme de tolérance des dommages à l'ADN" de la toute nouvelle IREBS, actuellement FRE3211, mais je l'espère, plus pour longtemps.

Je tiens tout d'abord à remercier toute l'équipe, **Agnès, Régine, Elizabeth, Sandrine, Nadège, Marc et Jérôme** de m'avoir accueillie parmi vous pendant ces quatre courtes années.

Agnès, Régine, ensemble nous avons affronté le froid, la canicule, les films qui se coincent dans la développeuse, les gels qui migrent n'importe comment, les anticorps qui marchent quand ça les arrange, les heures en salle de culture, les centrikons nouvelle génération qui ont eu la bonne idée d'être commercialisés 3 mois avant la fin de ma thèse et j'en passe... Mais les efforts paient toujours et je suis sûre qu'un jour prochain PCNA et maintenant Rad18 vous auront livré tous leurs secrets.

Elizabeth, ma compagne de bureau, ce fut un réel plaisir de t'avoir rencontrée. Merci d'avoir toujours été prête à me rendre service. Ta gentillesse va me manquer.

Marc, je me souviens de ma première réunion. Elle a eu lieu un vendredi et Sandrine m'a fait découvrir le désormais célèbre (ceux qui ne sont pas au courant sont des ignares) mécanisme RAMER... Il m'a fallu du temps mais je crois que je commence à comprendre.

Sandrine, reine des mini et maxi preps (avec moi les maxi preps ne marchent jamais), ta bonne humeur et ton énergie me manqueront.

A **Jérôme**, toujours de bon conseil, qui arrive à dire en une phrase ce que j'essaie péniblement d'exprimer en dix.

Nadège, la petite nouvelle, j'espère que tu obtiendras une bourse et que tu arriveras à apprivoiser Rad18.

Je tiens aussi à remercier Mmes **Patricia KANNOUCHE, Emmanuelle DELAGOUTTE** et Mr **Bruno CHATTON** d'avoir accepté de juger mon travail de thèse.

Aux doctorants du bout du couloir:

Elise, bonne chance pour ta quatrième année de thèse. Maintenant que j'ai fini de rédiger, j'envisage de me remettre au sport et pourquoi pas de courir... Une bonne résolution qui, je le crains, ne durera pas. Mais comme on dit c'est l'intention qui compte.

Christian, à nous deux, nous détenons le record du nombre d'heures en salle de culture. Sans aucun rapport, j'ai suivi ton conseil et j'ai vu "Southland Tales"..... et je n'ai rien compris... Je suis donc à la recherche d'un film bien corsé à te recommander, histoire que tu te rendes compte à quel point j'ai souffert !

Thomas, bien que me trouvant bien loin de ta paillasse, je t'ai souvent entendu rouspéter... Tu as bien raison, ça fait du bien!

Aux absents

Anne-Sophie, j'aurais beaucoup aimé que tu restes avec nous mais je suis sûre que tu te plais dans ton nouveau labo et que tu vas révolutionner la science.

Delphine, tu ne seras pas là pour ma soutenance car tu es partie rendre visite à l'Oncle Sam. Je te souhaite plein de découvertes ébouriffantes.

A **Tonie**, qui s'est souvent inquiétée de ne pas me voir manger à la cantine. Depuis qu'on se connaît, j'ai pris 4 kilos....

A ma famille

A **mes parents** qui m'ont toujours soutenue. A mon **papa** qui n'y croira que le jour J. A ma **maman**, première femme bionique, qui a réussi à tondre la pelouse avec une seule main.

A **mes frères** Alain et Fabien qui ont préféré le monde incompréhensible de la finance... Si, si, je vous assure, la mono-ubiquitination de PCNA, c'est très simple...

A mes **grand-mères** qui, pour mon plus grand plaisir, seront là toutes les deux pour ma soutenance.

Gg, tu ne seras pas là le jour J mais tu auras droit à un cours gratuit et un exemplaire dédicacé... Qui sait, un jour, tu pourras vendre ça une petite fortune su E-Bay.

A **Eric**, qui a été d'une patience infinie pendant tous ces mois de rédaction et qui s'inquiétait de ne pas me voir angoissée. Il est 23H34 et la thèse n'est toujours pas imprimée.... Non je ne panique pas.... Mais dès demain, nous allons pouvoir de nouveau entendre les oiseaux chanter à 5 heures du matin, faire un tour en moto et préparer nos vacances...

Et pour finir, à **toux ceux qui vont assister à ma soutenance**.... Interrogation surprise pendant le pot.... Ceux qui ont la moyenne auront droit à une tarte flambée.... Ceux qui se sont endormis auront droit à une séance de rattrapage individuelle...

Résumé:

Le génome des cellules est constamment soumis à des agressions exogènes ou endogènes qui créent des lésions sur l'ADN. La synthèse translésionnelle (TLS) permet à la cellule de répliquer l'ADN endommagé grâce à l'intervention d'ADN polymérase spécialisées. En réponse à des agents génotoxiques, le facteur de processivité PCNA, qui interagit avec les ADN polymérase répliquatives et translésionnelles, est mono-ubiquitiné par le complexe Rad6/Rad18. Durant ma thèse, j'ai cherché à (1) comprendre les événements moléculaires qui déclenchent la mono-ubiquitination de PCNA et (2) à comprendre le rôle de cette modification dans la TLS.

(1) Un test *in vitro* de réplication d'ADN endommagé, dans des extraits cellulaires humains, montre que la mono-ubiquitination de PCNA nécessite une synthèse d'ADN de plus de 40 nucléotides et le blocage au niveau d'une lésion. Cela suggère un processus dynamique au cours duquel le complexe de réplication évolue pour adopter une conformation "mature" nécessaire à l'activation de Rad6/Rad18.

(2) L'étude *in vitro* du franchissement de 2 lésions différentes (TT-CPD et G-AAF) par l'ADN polymérase translésionnelle Pol η révèle l'existence d'une voie de TLS indépendante de la mono-ubiquitination de PCNA. De plus, la complémentation de cellules déficientes en Pol η par des mutants d'interaction avec PCNA (PIP) et/ou avec l'ubiquitine (UBZ) montre que chacun de ces domaines contribue à l'activité de Pol η pour les deux types de lésion. Le domaine UBZ jouerait alors un rôle supplémentaire, non relié à la liaison à l'ubiquitine de PCNA.

Abstract:

The cell's genome is constantly subjected to exogenous and endogenous attacks, which create lesions on the DNA. TransLesion Synthesis (TLS) allows the cell to replicate over lesions by the use of specialized DNA polymerases. In response to genotoxic agents, the processivity factor PCNA, which interacts with replicative and translesional DNA polymerases, is mono-ubiquitinated by the Rad6/Rad18 complex. During my thesis, I try to understand (1) the molecular events that lead to the mono-ubiquitination of PCNA and (2) the role of this modification during TLS.

(1) By using an *in vitro* replication assay of damaged DNA and human cell-free extracts, we show that the mono-ubiquitination of PCNA requires the synthesis of DNA longer than 40 nucleotides and the block at the lesion. This suggest a dynamic process during which the replication complex evolves to adopt a "mature" conformation necessary for the activation of Rad6/Rad18.

(2) The *in vitro* study of the synthesis in front of two different lesions (TT-CPD and G-AAF) by the translesional DNA polymerase Pol η reveals the existence of a TLS pathway independant of the mono-ubiquitination of PCNA. Furthermore, the complementation of Pol η -deficient cells by PCNA (PIP) and/or ubiquitin (UBZ) interaction mutants shows that each of these domains contribute to the activity of Pol η for both lesions. Thus, the UBZ domain may play an additionnal role that is not related to the interaction with mono-ubiquitinated PCNA.

Sommaire

| | |
|--|-----------|
| INTRODUCTION..... | 11 |
| 1. Les réponses cellulaires aux dommages de l'ADN | 15 |
| A. Les différents types de lésion de l'ADN et les mécanismes de réparation | 17 |
| 1. Les lésions de l'ADN dues à des agents exogènes..... | 18 |
| 2. Les lésions spontanées de l'ADN dues au métabolisme cellulaire | 21 |
| 3. Les obstacles naturels de la réplication..... | 21 |
| 4. Les mécanismes de réparation des lésions de l'ADN | 24 |
| B. Le signalement des dommages | 26 |
| 1. Activation d'ATM en réponse aux cassures double-brin..... | 28 |
| 2. Activation d'ATR en réponse aux anomalies de la réplication | 29 |
| C. La tolérance des dommages..... | 34 |
| 1. Les protéines Rad6 et Rad18 | 36 |
| 2. Le système d'ubiquitination | 38 |
| 3. Les modifications post-traductionnelles de PCNA | 39 |
| a. Généralités sur PCNA..... | 39 |
| b. La mono-ubiquitination de PCNA..... | 42 |
| c. La poly-ubiquitination de PCNA..... | 48 |
| d. Mono-ubiquitination de PCNA indépendante de Rad18 | 51 |
| 2. La synthèse translésionnelle (TLS) | 53 |
| A. Les ADN polymérases translésionnelles..... | 55 |
| 1. Généralités | 56 |
| 2. Pol η | 58 |
| a. <i>Xeroderma pigmentosum</i> variant..... | 59 |
| b. Les différents domaines de Pol η | 60 |
| c. Accumulation aux foyers de réplication | 61 |

| | |
|--|-----------|
| d. Régulation de Polη | 63 |
| e. Les différents rôles de Polη | 66 |
| 3. Polι | 70 |
| a. Domaines et interactions de Polι | 70 |
| b. Les fonctions de Polι | 71 |
| 4. Polκ | 73 |
| a. Régulation de l'expression | 73 |
| b. Les domaines de Polκ et les interactions avec des protéines | 74 |
| c. Localisation aux foyers de réplication | 75 |
| d. Les fonctions de Polκ | 76 |
| 5. La plate-forme Rev1 | 77 |
| a. Expression et régulation | 77 |
| b. Interactions protéiques | 78 |
| c. Localisation aux foyers | 79 |
| d. Rôles | 80 |
| 6. Polζ | 81 |
| | |
| B. Les modèles de la synthèse translésionnelle | 84 |
| 1. Echange des ADN polymérase à la fourche de réplication | 84 |
| 2. Réaction de TLS au niveau des brèches d'ADN simple-brin | 87 |
| 3. Retour de l'ADN polymérase réplivative | 89 |
| | |
| 3. Objectifs de mon travail de thèse | 91 |
| | |
| RESULTATS ET DISCUSSION..... | 95 |
| | |
| Première partie: Régulation de la mono-ubiquitination de PCNA..... | 99 |
| 1. Introduction | 101 |
| 2. Mono-ubiquitination de PCNA dans les extraits de cellules humaines | 102 |
| | |
| A. Résultats | 102 |
| 1. La mono-ubiquitination de PCNA dans les extraits de cellules humaines nécessite l'extension de l'amorce | 102 |
| 2. La mono-ubiquitination de PCNA est couplée aux pauses du complexe de réplication | 104 |

| | |
|---|------------|
| 3. Le taux de mono-ubiquitination de PCNA augmente avec la taille des fragments d'ADN synthétisés par un complexe de réplication processif | 108 |
| B. Conclusion | 111 |
| C. Perspectives | 113 |
| 3. L'activation de Rad18 | 118 |
| A. Données bibliographiques sur Rad18 | 118 |
| 1. Les domaines de Rad18 | 118 |
| 2. Les rôles de Rad18 | 120 |
| 3. Les modifications post-traductionnelles de Rad18 | 122 |
| 4. La localisation de Rad18 durant le cycle cellulaire en absence de dommages induits | 123 |
| 5. Relocalisation de Rad18 après dommages | 124 |
| B. Effets de mutations de Rad18 sur sa localisation et son activité <i>in vivo</i> | 125 |
| 1. Localisation de Rad18 dans la lignée MRC5 en absence ou en présence de dommages induits par les UV | 126 |
| 2. Localisation intracellulaire des trois mutants de Rad18 | 127 |
| 3. Effets des trois mutations de Rad18 sur la mono-ubiquitination de PCNA en réponse aux UV | 128 |
| C. Effet d'inhibiteurs de kinases sur la mono-ubiquitination de PCNA <i>in vitro</i> | 129 |
| D. Conclusion et perspectives | 133 |
| Deuxième partie: Etude de la contribution des domaines PIP et UBZ de Polη lors du franchissement des lésions TT-CPD et G-AAF dans des extraits de cellules humaines. | 135 |
| 1. Introduction | 137 |
| 2. Résultats et discussion | 139 |
| A. Pol η et PCNA sont impliqués dans le franchissement du G-AAF et du TT-CPD dans les extraits de cellules humaines | 139 |

| | |
|--|------------|
| B. Le franchissement des TT-CPD, contrairement à celui du G-AAF est indépendant de Rad18 dans les extraits cellulaires | 140 |
| C. Contributions des domaines PIP et UBZ de Polη pour son activité <i>in vivo</i> | 147 |
| D. Les deux domaines PIP et UBZ contribuent au franchissement des lésions TT-CPD et G-AAF <i>in vitro</i> | 149 |
| 3. Conclusion et perspectives | 151 |
| CONCLUSION GENERALE..... | 155 |
| ANNEXES..... | 161 |
| 1. Article 1 | 163 |
| 2. Article 2 | 171 |
| 3. Matériels et méthodes supplémentaires | 185 |
| A. Electrophorèse bi-dimensionnelle | 187 |
| 1.Préparation des échantillons..... | 187 |
| 2. Première dimension | 187 |
| a. Réhydratation | 187 |
| b. Focalisation isoélectrique..... | 188 |
| c. Equilibration des strips pour la deuxième dimension | 188 |
| d. Deuxième dimension..... | 188 |
| e. Coloration | 188 |
| B. Mutagenèse dirigée | 190 |
| BIBLIOGRAPHIE..... | 191 |

INTRODUCTION

Les mutations de l'ADN engendrent la diversité génétique qui peut être soit délétère soit avantageuse pour la survie de la cellule. Du point de vue de l'évolution, la mutagenèse est le mécanisme par lequel la sélection naturelle agit et elle est la base de l'adaptation et de la diversification des espèces. La mutagenèse est aussi impliquée dans l'hypermutation somatique lors de la génération d'anticorps (Friedberg, 2005) au niveau cellulaire, cependant, la mutagenèse est risquée. Bien que de nombreuses mutations soient silencieuses ou mènent à l'apoptose, certaines causent des aberrations et une prolifération cellulaire incontrôlée, marque première des cancers.

Les mutations peuvent subvenir lors d'une synthèse impropre d'un ADN lésé (cassure double ou simple brin, adduits covalents ou bases manquantes ou altérées). De telles lésions sont le résultat de processus métaboliques de la cellule elle-même aussi bien que d'agents exogènes endommageant l'ADN (radiations ionisantes, radiations UV, agents chimiques comme le cisplatine...). Dans les cellules eucaryotes, des voies extrêmement conservées connues sous le nom de checkpoint coordonnent de nombreux aspects de la réponse aux dommages de l'ADN en induisant l'arrêt du cycle cellulaire, en activant la réparation de l'ADN et, dans certains cas, en initiant les voies apoptotiques (Nyberg et al., 2002; Cimprich and Cortez, 2008).

Lors de la phase S, le génome est particulièrement vulnérable et de nombreux types de lésions peuvent bloquer la progression de la fourche de réplication. De fait, un arrêt prolongé des fourches de réplication peut entraîner leur effondrement, des cassures double brin et l'instabilité génétique. La stabilisation et la sauvegarde des fourches bloquées et enfin l'achèvement de la réplication sont essentiels pour la survie de la cellule et la préservation du génome (Paulsen and Cimprich, 2007; Cimprich and Cortez, 2008).

Les mécanismes de tolérance des dommages ou processus de réparation post-répllicative permettent à la cellule de répliquer l'ADN malgré le blocage des polymérases répliquatives (Friedberg, 2005; Andersen et al., 2008). Bien que largement utilisé, le terme de « réparation post-répllicative » est peu adéquat puisque la lésion ne sera réparée que plus tard. Ce terme englobe deux mécanismes distincts qui diffèrent dans leur potentiel à induire des mutations : la synthèse translésionnelle (TLS) et le contournement des lésions. Durant la synthèse translésionnelle, des ADN polymérases spécialisées répliquent l'ADN endommagé en introduisant ou non des erreurs. Durant le second mécanisme, au contraire, la lésion est évitée grâce à l'utilisation du brin fils du brin complémentaire non endommagé comme matrice, ce qui permet d'éviter l'insertion de mutations. Parce que l'ADN synthétisé malgré les lésions sera utilisé comme modèle pour les réplifications suivantes, le choix entre ces deux

procédés est de la plus grande importance. La modification post-traductionnelle de PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen), facteur de processivité des ADN polymérases répliquatives, joue un rôle très important dans la coordination de la réplication de l'ADN et des processus de tolérance des dommages (Moldovan et al., 2007; Andersen et al., 2008). En effet, le type de modification post-traductionnelle de PCNA détermine la voie utilisée.

PCNA est mono-ubiquitiné au niveau de sa lysine K164 par le complexe Rad6/Rad18 en réponses à des dommages de l'ADN (Hoege et al., 2002) et cette modification permettrait le recrutement des ADN polymérases spécialisées qui remplaceraient alors transitoirement l'ADN polymérase répliquative. Chez *Saccharomyces cerevisiae*, la SUMOylation de K164 de PCNA (Hoege et al., 2002) permet de recruter l'hélicase Srs2 qui empêche la recombinaison homologue aux fourches de réplication bloquées (Watts, 2006). La perturbation de la réplication peut aussi induire la poly-ubiquitination de PCNA via la lysine K63 chez les vertébrés et la levure (Hoege et al., 2002; Chang et al., 2006; Chiu et al., 2006; Frampton et al., 2006). La poly-ubiquitination serait à l'origine du contournement des lésions.

De nombreuses questions restent cependant sans réponses. Le rôle exact de la mono-ubiquitination de PCNA et la régulation de l'accès des différentes ADN polymérases translésionnelles au niveau de l'ADN endommagé sont sujets à discussion. Nous ne savons pas non plus comment est choisie la polymérase la plus appropriée pour une lésion donnée. Enfin, le mystère reste entier quant à la manière dont la poly-ubiquitination de PCNA est à l'origine du changement de matrice de l'ADN polymérase répliquative.

Au cours de ma thèse, je me suis tout particulièrement intéressée à la régulation de la mono-ubiquitination de PCNA par le complexe Rad6/Rad18 et au rôle de cette modification dans la synthèse translésionnelle.

Dans l'introduction, je présenterai brièvement les lésions de l'ADN et les différents mécanismes de réparation existants ainsi que les mécanismes de surveillance du cycle cellulaire. La troisième partie sera consacrée aux mécanismes de tolérance des dommages de l'ADN, contrôlés par la voie Rad6/Rad18 et aux modifications post-traductionnelles de PCNA. Par la suite, je présenterai les différentes ADN polymérases translésionnelles. Je finirai cette introduction par la présentation des différents modèles proposés pour le mécanisme de la synthèse translésionnelle.

1. Les réponses cellulaires aux dommages de l'ADN

A. Les différents types de lésion de l'ADN et les mécanismes de réparation

Les dommages de l'ADN constituent un **obstacle majeur** aux fonctions de la cellule. Des lésions et des cassures interfèrent avec la réplication, causant potentiellement des mutations, ou avec la transcription, affectant l'expression des gènes et la physiologie cellulaire. Les lésions de l'ADN sont courantes, ainsi **30 000 lésions** sont **générées** spontanément **dans une cellule de mammifères par jour** (Lindahl and Barnes, 2000). La grande variété des lésions de l'ADN produites par divers agents endommageant a engendré l'évolution de différents mécanismes de réparation (Figure 1).

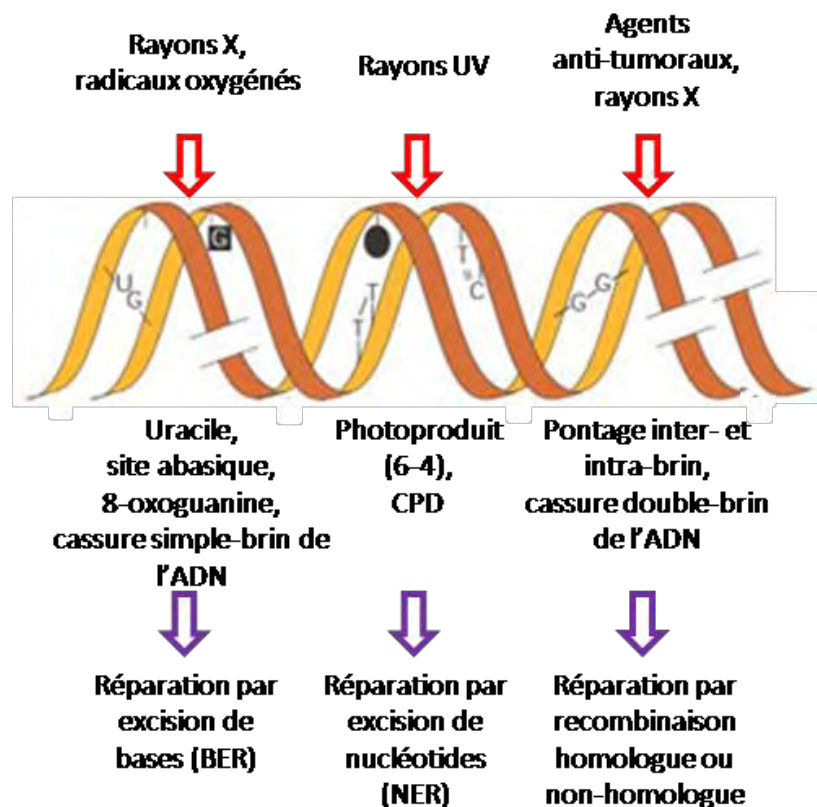


Figure 1: Les dommages de l'ADN et les mécanismes de réparation. Nous présentons ici quelques exemples de lésions de l'ADN causés par différents agents. Ainsi les rayons UV sont à l'origine de la formation de photoproduits comme les dimères de pyrimidines de type cyclobutane (CPD) ou les (6-4). Il est intéressant de noter que chaque type de lésions sera pris en charge par un mécanisme de réparation spécifique. La réparation par excision de nucléotide permet entre autre de réparer ces photoproduits. Adapté de (Hoeijmakers, 2001).

Les lésions de l'ADN sont causées par des **agents exogènes** (radiations ionisantes (IR), les radiations ultra violettes (UV) et divers agents chimiques) et des **réactions chimiques endogènes** (comme l'hydrolyse, l'oxydation, l'alkylation de bases).

1. Les lésions de l'ADN dues à des agents exogènes

L'exposition des cellules aux **radiations ionisantes** (rayons X, rayons γ) peut être à l'origine de l'arrêt du cycle cellulaire pour la réparation de l'ADN, de l'induction de mutations, et de la mort cellulaire. Les événements d'ionisation ne sont pas confinés à l'ADN et à son environnement immédiat. Les radicaux libres générés par les radiations peuvent aussi altérer les membranes au niveau des protéines et des lipides (Wallach, 1972). Cependant, **l'ADN est la cible privilégiée dans les cellules soumises à des radiations** (Ward, 1981). L'intégrité de l'ADN est affectée par une variété de lésions induites par les radiations ionisantes de manière directe ou indirecte. Les radiations interagissant directement avec l'ADN causent des **cassures simple-brin ou double-brin de l'ADN** (van der Schans et al., 1973). Cela représente à peu près 30% des dommages sur l'ADN (Chapman et al., 1973). Les 70% restant concernent des effets indirects dus à l'ionisation de molécules d'eau qui génère des électrons hydratés, des atomes d'hydrogène et des radicaux hydroxydés (Chapman et al., 1973). Ces radicaux endommagent l'ADN en formant notamment **des sites abasiques, des cassures simple et double-brin, des pontages ADN-protéine ou des déaminations des bases** (la cytosine en uracile; l'adénine en hypoxanthine ou inosine; guanine en xanthine ou oxanine; la 5-méthylcystéine en thymine (Figure 2) (Dizdaroglu et al., 1991; Teoule et Cadet 1978; Lindahl 1993).

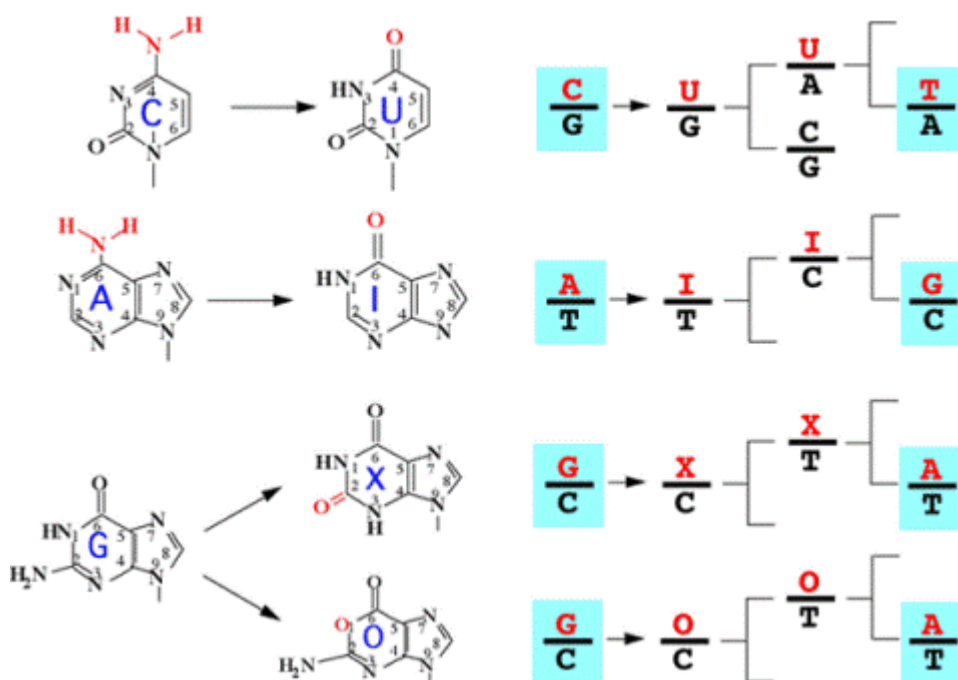


Figure 2: Déamination de bases et mutagenèse. Les déaminations de la cytosine (C) en uracile (U), de l'adénine (A) en inosine (I), de la guanine (G) en xanthine (X) ou oxanine (O) peuvent être à l'origine de mésappariements durant la réplication de l'ADN. Par exemple, la déamination de la cytosine en uracile cause la mutation de la paire C/G en T/A . <http://www.clemson.edu/cafls/departments/genbiochem/people/wcao.html>.

Une classe importante de lésions de l'ADN concerne les lésions dues aux **radiations UV-B**, dont le rôle dans la formation de cancer de la peau est critique. Cette corrélation a été découverte lors d'études sur la maladie *Xeroderma pigmentosum* (XP), dont les patients atteints présentent une forte probabilité de développer un cancer de la peau dans les zones exposées au soleil; leurs cellules somatiques, incapables de réparer les dimères de pyrimidines, sont hypersensibles aux UV (Cleaver and Bootsma, 1975). **Les dimères de pyrimidines de type cyclobutane**, qui peuvent apparaître aux sites TT, CC, CT ou TC du même brin d'ADN, sont les photo-lésions les plus communes (70 à 80 %)(Clingen et al., 1995). Les **photo-produits 6-4** sont moins fréquents (20 à 30%) (Figure 3).

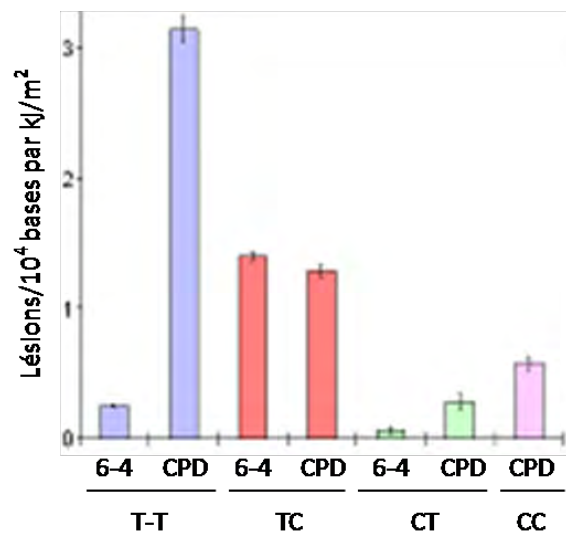


Figure 3: Rendements de formation des différents photophoduits bipyrimidiques dans des monocytes humains en culture exposés au rayonnement UV-B. T et C: thymine et cytosine. Adapté de http://inac.cea.fr/Phocea/Vie_des_labos/Ast/ast_visu.php?id_ast=140.

De plus, **des agents chimiques** peuvent causer des **adduits sur l'ADN**, des **bases oxydées, alkylées** ou des **pontages inter ou intra-brin**. Certains de ces agents sont utilisés pour lutter contre les cancers (Lindahl et al., 1982; Seeberg et al., 1995) (Tableau 1).

Tableau 1: Exemples d'agents chimiques endommageant l'ADN.

| Classe du produit chimique | Exemple | Origine de l'exposition | Lésion génotoxique probable |
|--|----------------------------------|--|--|
| Aflatoxines | Aflatoxine B1 | Aliments contaminés | Adduits de grande taille sur l'ADN |
| Amines aromatiques | 2-acétylamino-fluorène | Environnement | Adduits de grande taille sur l'ADN |
| Quinones aziridine | Mitomycine C | Chimiothérapie anticancéreuse | Mono-adduits, pontages inter-brin et cassures simple-brin de l'ADN |
| Hydrocarbures chlorés | Chlorure de vinyle | Environnement | Mono-adduits de l'ADN |
| Métaux et composés métalliques | Cisplatine Composés du nickel | Chimiothérapie anticancéreuse Environnement | Pontages intra et inter-brin de l'ADN Mono-adduits et cassures simple-brin de l'ADN |
| Moutardes azotées | Cyclophosphamide | Chimiothérapie anticancéreuse | Mono-adduits et pontages inter-brin de l'ADN |
| Nitrosamines | N-Nitrosodiméthylamine | Aliments contaminés | Mono-adduits de l'ADN |
| Hydrocarbures aromatiques polycycliques | Benzo(a)pyrène | Environnement | Adduits de grande taille sur l'ADN |

2. Les lésions spontanées de l'ADN dues au métabolisme cellulaire

Le **métabolisme oxydatif** des cellules crée des espèces oxydatives oxygénées (ou ROS) et **endommage dix mille bases** par cellule et par jour (Fortini et al., 2003). Cette production normale de ROS est contrecarrée par l'existence d'un système de détoxification complexe (superoxyde dismutase, catalase, glutathione peroxidase et peroxyredoxines) (Finkel and Holbrook, 2000).

Les espèces réactives de l'oxygène de la cellule réagissent avec l'ADN et produisent des **cassures simple-brin, des pontages ADN-protéines, des sites abasiques et des lésions oxydatives**. Dans le cas de ces dernières, on connaît environ cinquante adduits (Cadet et al., 1999), dont la **8-oxoguanosine (8-oxo-G)** qui est considérée comme la plus abondante (Kasai, 1997). Si la 8-oxo-G n'est pas réparée avant la réplication de l'ADN, elle peut s'apparier avec une adénine et donc mener à une transversion G vers T, mutation somatique commune dans les carcinomes humains (Wood et al., 1992; Grollman and Moriya, 1993). Cet adduit est considéré comme important dans la carcinogenèse humaine et a émergé en tant que biomarqueur des dommages oxydatifs cellulaires (Dizdaroglu, 1992; Cadet et al., 1999; Helbock et al., 1999).

Des hydrolyses de la liaison glycosidique peuvent aussi avoir lieu et entraînent la formation de **sites abasiques** ou AP (Lindahl, 1993). Les sites abasiques résultent de la dépurination ou dépyrimidination de nucléotides et il est estimé qu'environ dix mille sites AP apparaissent dans le génome humain par jour (Lindahl, 1993). La perte de base peut avoir lieu spontanément ou bien après une oxydation ou une alkylation de l'ADN.

3. Les obstacles naturels de la réplication

La réplication des chromosomes survient au cours de la phase S du cycle cellulaire et est initiée à de multiples origines de réplication qui sont activées en début, en milieu ou en fin de phase S. Chaque fourche de réplication doit répliquer plusieurs dizaines de milliers de bases avant de rencontrer une fourche convergente. Au cours de cette synthèse d'ADN, la progression des fourches de réplication peut être compromise par des barrières qui ralentissent ou bloquent les fourches. Ces barrières peuvent être dues à des structures secondaires de

l'ADN, à des complexes protéiques fermement ancrés sur l'ADN ou à la collision entre les machineries de réplication et de transcription. Ces obstacles peuvent mettre en péril l'intégrité des fourches de réplication et constituent une source potentielle d'instabilité du génome (revue Mirkin and Mirkin, 2007).

Si l'ADN existe normalement sous la forme d'une double hélice droite (forme B), des structures alternatives existent: structures cruciformes, en épingle à cheveux, en triple hélice (ADN H), en G-quartet (G4), en hélice gauche (ADN Z), etc... (Figure 4). De nombreuses évidences, à la fois *in vitro* et *in vivo*, indiquent que **la formation de structures secondaires d'ADN pourrait perturber la réplication**. *In vitro*, de nombreuses ADN polymérases sont inhibées par des séquences répétées inversées, (Bedinger et al., 1989; Sherman and Gefter, 1976; Weaver and DePamphilis, 1982), par des G4 (Woodford et al., 1994; Usdin and Woodford, 1995; Weitzmann et al., 1997) ou par des séquences répétées en miroir (Baran et al., 1991; Dayn et al., 1992; Krasilnikov et al., 1997). *In vivo*, la formation de structures secondaires au niveau de séquences répétées induit une inhibition de la réplication que ce soit chez la bactérie, chez la levure ou dans les cellules de mammifères (Brinton et al., 1991; Samadashwily et al., 1997; Voineagu et al., 2008; Mirkin and Mirkin, 2007).

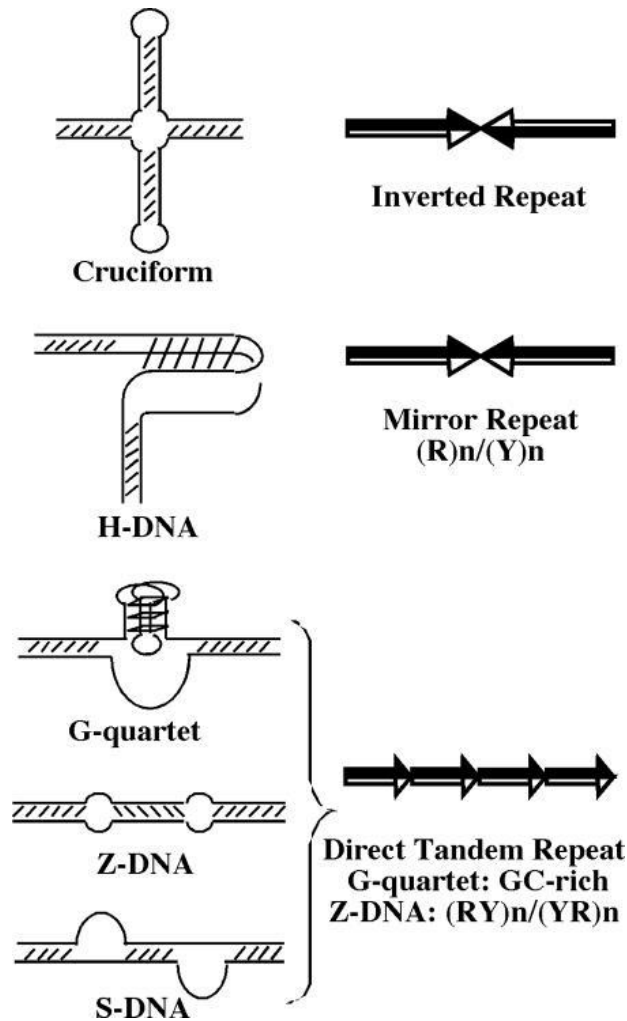


Figure 4: Structures inhabituelles de l'ADN (à gauche) et les types de répétitions à l'origine de leur formation (à droite). Trois types majeurs de répétition de l'ADN en sont à l'origine: les répétitions inversées, les répétitions en miroir et les répétitions en tandem. Les séquences répétées sont en noir. En ce qui concerne les **répétitions inversées**, les bases équidistantes du centre de symétrie de la molécule sur un brin d'ADN sont associées aux bases complémentaires en respectant la structure Watson-Crick. Ces séquences sont capables d'adopter des structures cruciformes lorsque l'ADN est sous forme double-brin, ou en épingle à cheveux lorsque l'ADN est sous forme simple-brin. Dans les **répétitions en miroir**, les bases de part et d'autre de l'axe de symétrie sont identiques. Les séquences miroirs d'homopurine-homopyrimidines sont capables d'adopter des structures en triple hélice ADN-H. Ce type de séquences capables d'adopter des structures en ADN-H sont abondantes dans le génome humain puisqu'elles sont retrouvées environ toutes les 50 000 paires de bases. En outre, elles sont majoritairement présentes au niveau des promoteurs et des exons et peuvent réguler de ce fait l'expression de certains gènes liés à des maladies. Dans les répétitions en tandem, les séquences répétées sont continues le long d'un brin d'ADN. Une structure appelée G-quartet ou G-quadruplex (G4) peut être facilitée par des répétitions directes riches en G. Les séquences télomériques (TTAGGG)_n étant riches en G peuvent former spontanément une structure en G4 *in vitro* mais aussi *in vivo*. D'autre part, les séquences répétées présentant une alternance régulière entre purines et pyrimidines peuvent adopter une structure en hélice gauche avec un arrangement en zigzag de la structure centrale de la molécule d'ADN (ADN-Z). Par ailleurs, les séquences susceptibles d'adopter des structures en ADN-Z sont abondantes dans le génome humain puisqu'elles seraient présentes toutes les 3000 paires de base. En outre, ces séquences peuvent induire dans les cellules humaines de larges délétions indépendamment de la réplication. Adapté de Mirkin and Mirkin, 2007.

Les sites fragiles sont des régions du génome difficiles à répliquer et où se produisent préférentiellement des cassures. Ces sites fragiles sont classés en deux grands groupes : **les sites fragiles rares (SFR) qui sont présents dans moins de 5 % de la population et les sites fragiles communs (SFC) qui sont présents chez tous les individus** (Kremer et al., 1991; Sutherland et al., 1998).

4. Les mécanismes de réparation des lésions de l'ADN

La réparation par excision de nucléotides (NER) est un mécanisme complexe qui concerne une grande variété de dommages de l'ADN, incluant les lésions causées par les UV et les produits chimiques ou les adduits sur l'ADN formés par les drogues anticancéreuses (Leibeling et al., 2006). Deux modes existent: le **NER global** (global genome NER ou GG-NER) qui surveille le génome en entier et **la réparation couplée à la transcription (TCR)** qui se focalise sur les dommages qui bloquent les ARN polymérases (Tornaletti and Hanawalt, 1999) et répare donc les gènes transcrits. **La réparation par excision de bases (BER)** cible les dommages dus au métabolisme cellulaire (ROS, méthylation, désamination, hydrolyse). Les lésions concernant ces deux mécanismes affectent un seul des deux brins d'ADN.

Les mécanismes de **recombinaison homologue (HR)** et **non homologue (NHEJ)** sont impliqués dans la réparation des cassures double-brin de l'ADN (CDB). La recombinaison homologue est prédominante en phase S et en G2 quand l'ADN est répliqué, ce qui permet d'utiliser la seconde copie pour aligner correctement les cassures. La recombinaison non homologue intervient en phase G1, quand la seconde copie n'est pas disponible (Takata et al., 1998).

Enfin, certaines protéines de réparation sont capables d'intervenir seules pour réparer directement certaines lésions, comme la **O⁶-méthylguanine tranférase** (Lindahl et al., 1988) et les **photolyases** (Sancar, 1994).

De nombreux syndromes humains sont associés à des défauts dans ces mécanismes de réparation (Tableau 2).

Tableau 2: Syndromes humains présentant des défauts dans la réparations des lésions de l'ADN. Adapté de Hoeijmakers 2001.

| Syndrome | Mécanisme affecté | Type de dommages | Prédisposition au cancer |
|---|--------------------------------|------------------------------|-------------------------------------|
| <i>Xeroderma pigmentosum</i> | NER | Mutations | Cancer de la peau induit par les UV |
| Syndrome de Cockayne | TCR | Mutations | Aucun |
| Trichothiodystrophie | NER/TCR | Mutations | Aucun |
| BRCA1/BRCA2 | HR | Aberrations chromosomiques | Cancer du sein |
| Syndrome des cassures de Nijmegen | Réparation des CDB | Aberrations chromosomiques | Lymphome |
| Syndromes de Ligase IV, d'Artémis, de Cernunnos et de SCID (gènes KU86/KU70) | Réparation des CDB par le NHEJ | Fidélité de la recombinaison | Immunodéficiency et leucémies |
| Syndromes de Werner et Bloom | HR | Aberrations chromosomiques | Cancers variés |

B. Le signalement des dommages

Les différentes kinases dépendantes des cyclines (Cdk) assurent la progression du cycle cellulaire en intervenant dans un ordre déterminé: en phase G1 et pour la transition G1-S, c'est à dire pour le déclenchement de la réplication de l'ADN, en phase S pour la poursuite de la réplication, en phase G2 et pour la transition G2-M, c'est à dire pour le déclenchement et l'exécution de la mitose.

Les **mécanismes de surveillance** s'ajoutent à la régulation de la succession des quatre phases du cycle par les Cdk. Ils permettent de signaler les molécules d'ADN endommagés **avant, pendant et après leur réplication** (**DDCP** = DNA Damage Checkpoint), les **anomalies de la réplication avant l'entrée en mitose** (**RCP** = Replication Checkpoint) et un **mauvais positionnement des chromosomes** sur la plaque métaphasique avant la séparation des chromatides-sœurs (**MPC** = mitotic Checkpoint) (Figure 5).

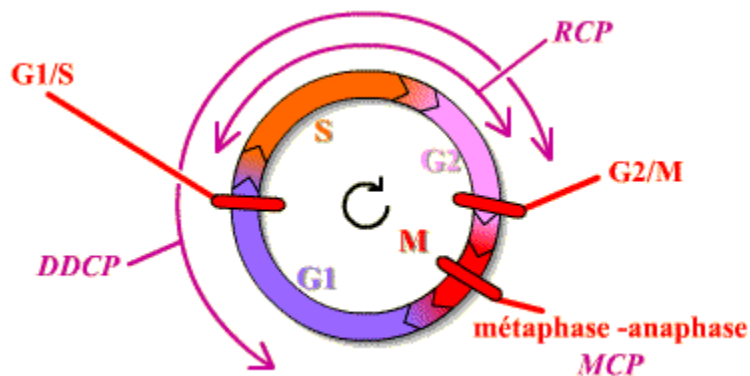


Figure 5: Le cycle cellulaire et les mécanismes capables de surveillance. Ces mécanismes interviennent lorsque des lésions (**DDCP** = **DNA Damage Checkpoint**) ou des anomalies de réplication de l'ADN (**RCP** = **Réplication Checkpoint**) sont détectées, ou pour contrôler que les chromatides-sœurs se répartissent équitablement dans les deux cellules filles (**MCP** = **Mitotic Checkpoint**). Ils assurent en quelque sorte le « contrôle qualité » du cycle cellulaire. En effet, si seules les Cdk intervenaient, l'enchaînement des phases du cycle pourrait continuer à avoir lieu, même si l'ADN était endommagé, ce qui conduirait finalement à des anomalies génétiques ou chromosomiques graves pour les cellules, par exemple la perte d'un chromosome ou d'un morceau d'ADN. <http://www.snv.jussieu.fr/bmedia/cyclecellBM/03points.htm>

ATM et **ATR** sont les deux protéines principales qui activent les checkpoints en réponse aux dommages. Ces deux protéines appartiennent à une famille possédant des domaines catalytiques ressemblant à ceux trouvés dans la kinase PI3K (phosphatidylinositol 3-kinase) et sont donc appelés des « PIK3-like proteines kinases » (**PIKK**). Elles phosphorylent les protéines au niveau de leurs résidus sérine et thréonine, dans des **séquences SQ/TQ** (la sérine ou la thréonine est suivie par la glutamine) (Brown et al., 2000). Les domaines riches en SQ/TQ sont souvent trouvés dans les protéines impliquées dans l'activation des checkpoints et la réparation de l'ADN (BRCA1, Chk1). L'activation d'ATM

et d'ATR est distincte mais les fonctions de ces deux kinases sont redondantes. ATM est activée en réponse aux cassures double-brin de l'ADN et est impliquée dans leur réparation, tandis qu'ATR est activée en réponse aux anomalies de la réplication et est impliquée dans le ralentissement et la stabilisation des fourches de réplication. Schématiquement, les kinases ATM et ATR ont deux types d'effets. Tout d'abord, elles phosphorylent et activent les kinases **Chk2** et **Chk1** qui phosphorylent et inactivent les phosphatases **CDC25A** et **CDC25C** (Mayland et al., 2000). En conséquence, CDK2 et CDK1 restent inactives, et **le cycle cellulaire est arrêté**, respectivement, en G1/S et en G2/M (Figure 6). Deuxièmement, la phosphorylation de **p53** par ATM/ATR et Chk2/Chk1 (Efeyan and Serrano, 2007) inhibe son export du noyau et sa dégradation, entraînant une accumulation de p53. p53 est à l'origine du **maintien de l'arrêt du cycle cellulaire** notamment par l'induction de l'expression de **p21**, inhibiteur des Cdk et la **répression de la transcription** de Cdc2 et de la cycline B aboutissant à une inhibition totale des mécanismes d'entrée en mitose.

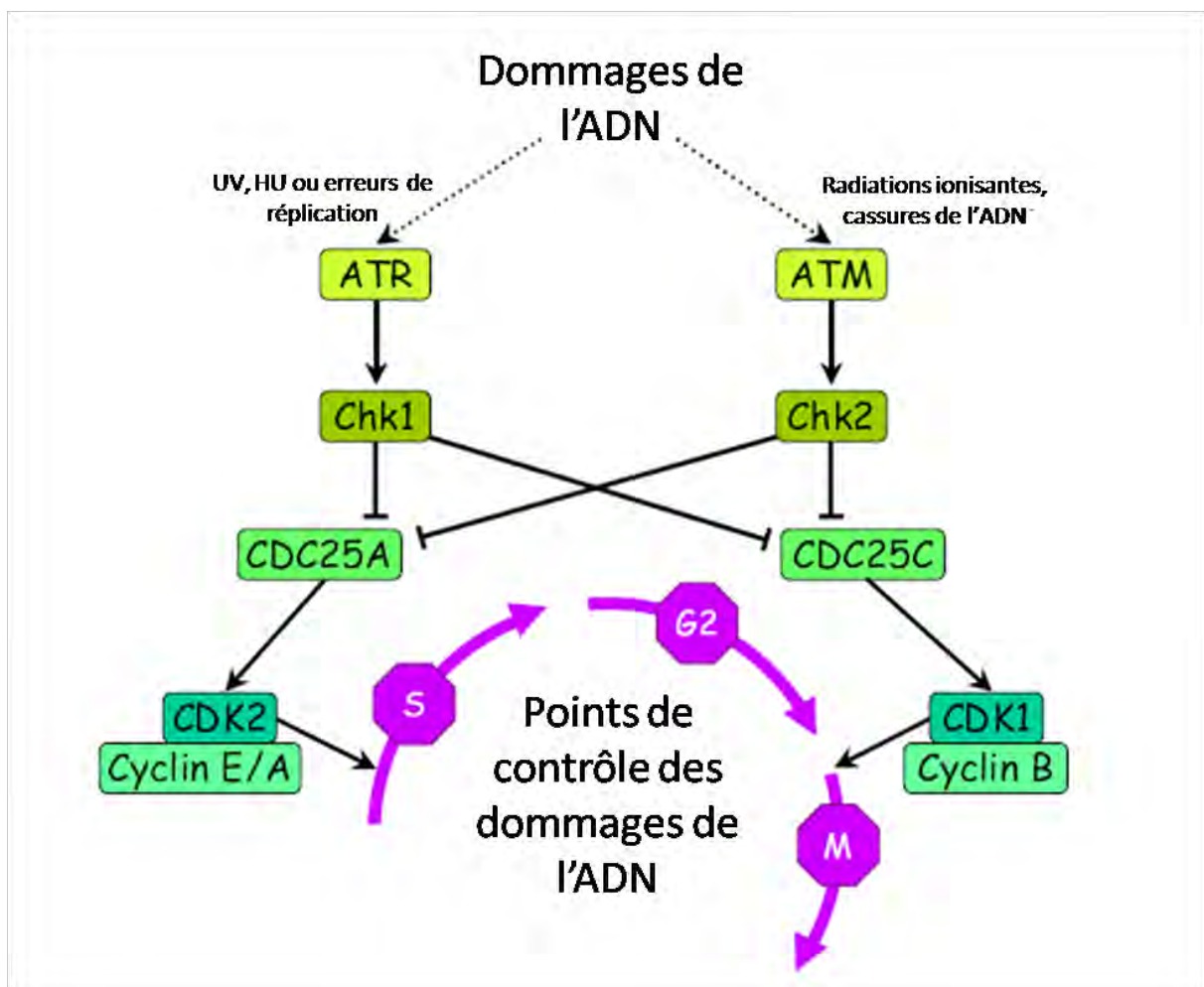


Figure 6: Le contrôle de l'état de l'ADN et l'arrêt en G1 ou en G2. Adapté de Meijer, 2003.

Une mutation inactivant le gène codant pour ATM est à l'origine de la maladie génétique **Ataxie télangiectasie** ou syndrome de Louis-Bar, caractérisée par une atteinte du système nerveux (ataxie cérébelleuse), des signes cutanés (télangiectasies), une immunodéficience et une susceptibilité aux cancers (leucémie et lymphome) (Shiloh, 1997). ATR est essentielle pour la viabilité des cellules et une mutation hypomorphe du gène codant pour ATR est responsable du **syndrome de Seckel**. Les caractéristiques les plus fréquentes de ce syndrome sont la microcéphalie, le nanisme sévère et une prédisposition aux leucémies (O'Driscoll et al., 2003).

1. Activation d'ATM en réponse aux cassures double-brin

ATM est une protéine oligomérique de 350 kDa dont l'activité kinase est stimulée *in vivo* par les agents qui induisent des **cassures double-brin de l'ADN** (Banin et al., 1998). NBS1 forme avec Mre11 et Rad50 le complexe **M/R/N qui s'associe à ATM et permet son recrutement et son activation au site de lésion** (Lee and Paull, 2004). L'**autophosphorylation** de ATM sur sa sérine 1981 permet à la protéine de passer d'une forme multimérique inactive à une **forme monomérique active** (Bakkenist and Kastan, 2003). Le mécanisme d'autophosphorylation n'est pas très bien défini mais la phosphatase PPA2 semble impliquée (Goodarzi et al., 2004). En absence de lésions, ATM et PPA2 sont associées. Les dommages induisent la dissociation de ce complexe, puis l'autophosphorylation d'ATM. Par ailleurs ATM est acétylée par l'histone acétylase Tip60, ce qui semble réguler son activité (Sun et al., 2005) (Figure 7).

Une fois activée, ATM phosphoryle de nombreuses protéines dont le variant d'histone **H2AX**, qui va alors recruter **MDC1** (Mediator of DNA damage checkpoint protein 1), conduisant au recrutement d'autres complexes MRN-ATM et donc à l'amplification du signal par phosphorylation d'autres protéines H2AX. ATM activée phosphoryle aussi d'autres cibles dont **Chk2** (Matsuoka et al., 2000), qui va elle-même phosphoryler d'autres substrats, comme Cdc25A, empêchant **l'entrée en mitose tant que les dommages de l'ADN ne sont pas réparés** (Matsuoka et al., 1998; Zhou et al., 2000). La phosphorylation de Chk2 permet aussi **d'arrêter les cellules en phase G1 du cycle cellulaire** en agissant d'une part au niveau de **p53** (Sherr and Roberts, 1999; Ekholm and Reed, 2000) et d'autre part au niveau de la protéine **Cdc25A** (Mailand et al., 2000). En outre, la phosphorylation de Chk2 permet de

contrôler la **réparation des cassures double-brin de l'ADN**, en relocalisant BRCA1 (Breast cancer 1) (Lee et al., 2000; Zhang et al., 2004; Wang et al., 2006; Zhuang et al., 2006). Enfin, Chk2 participe aussi à l'**activation de la voie d'apoptose** lorsque les dommages sont trop importants (Stevens et al., 2003).

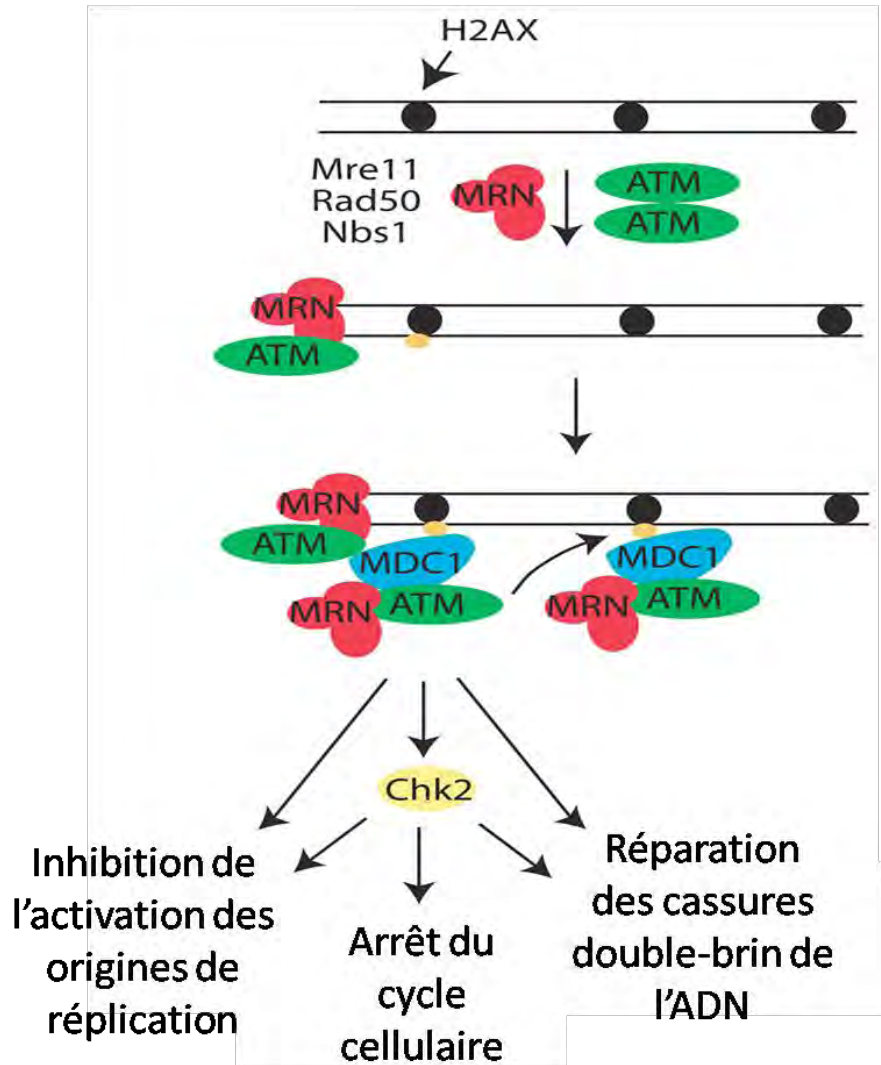


Figure 7: Modèle de l'activation d'ATM. La formation de cassures double-brin de l'ADN mène au recrutement du complexe MRN et à la dissociation de la forme dimérique inactive d'ATM en une forme monomérique et phosphorylée. Cette forme monomérique se lie au complexe MRN au niveau de la cassure et est activée. ATM peut alors phosphoryler H2AX qui va se lier à MDC1, ce qui mène au recrutement d'autres complexes ATM/MRN et à la phosphorylation de H2AX. ATM phosphoryle d'autres cibles comme Chk2. La phosphorylation de ces cibles mènent à l'arrêt du cycle cellulaire, l'inhibition de l'activation des origines de répliation en phase S et la réparation des cassures double-brin de l'ADN. Adapté de Cimprich and Cortez, 2008.

2. Activation d'ATR en réponse aux anomalies de la répliation

ATR a été découvert en raison de son homologie de séquence avec ATM et SpRad3, d'où son nom ATR pour *ATM* and *Rad3* related (Cimprich et al., 1996). ATR est une protéine de 303 kDa qui possède en C-terminal un domaine kinase et des régions homologues à celles d'autres membres de la famille PIKK. ATR phosphoryle les mêmes cibles qu'ATM et est le

principal membre de la famille PIKK qui initie la transduction du signal après une irradiation aux UV (Abraham, 2001). Dans les cellules humaines, ATR existe dans un complexe stable avec son partenaire ATRIP (ATR-interacting protein).

Dans des conditions qui freinent la réplication (lésions de l'ADN, déplétion des nucléotides par l'hydroxy-urée, compétition par l'aphidicoline), le découplage entre l'activité de l'hélicase et celle de la polymérase répliquative entraîne la formation d'ADN simple-brin (Sogo et al., 2002; Byun et al., 2005; Nedelcheva et al., 2005) protégée par la protéine de réplication A (RPA) (Zou and Elledge, 2003). L'activation d'ATR résulte de deux voies indépendantes qui convergent sur l'ADN simple-brin recouvert de RPA pour former un complexe actif ATR-ATRIP-TopBP1-9-1-1. L'interaction directe de ATRIP et RPA permet la liaison d'ATR sur l'ADN (Zou and Elledge, 2003). De façon, indépendante, la protéine TopBP1 (topoisomerase (DNA) II binding protein 1) lie l'ADN simple-brin soit directement, soit par l'intermédiaire de RPA ou d'une autre protéine inconnue (Yan and Michael, 2009) (Figure 8).

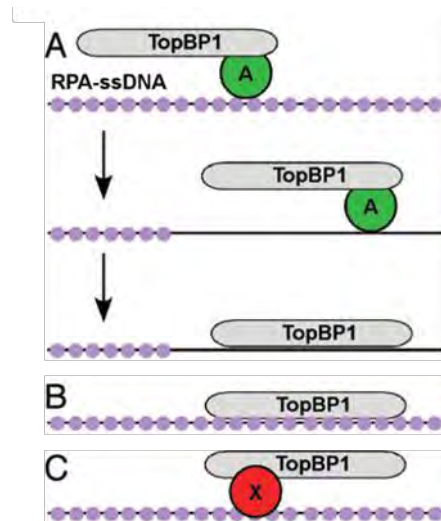


Figure 8: Trois mécanismes sont possibles pour le recrutement de TopBP1 au niveau des fourches de réplication bloquées. A. Liaison directe entre TopBP1 et l'ADN simple-brin, RPA ayant quitté l'ADN par l'action d'une protéine inconnue appelée A. **B.** Recrutement de TopBP1 par RPA. **C.** Recrutement de TopBP1 par un facteur inconnu X. Adapté de Yan and Michael, 2009.

TopBP1 recrute alors Pol α qui synthétise une amorce, créant ainsi une jonction ADN simple-brin/ADN double brin. TopBP1 recrute à la fois Rad17-RFC et 9-1-1 et le chargement de ce dernier a lieu à l'extrémité 5' de l'amorce synthétisée par Pol α (Bermudez et al., 2003 ; Ellison and Stillman, 2003 ; Majka et al., 2006). L'interaction TopBP1/9-1-1 persiste avec le chargement et ce complexe rejoint ATR-ATRIP (Yan and Michael, 2009) pour activer ATR (Kumagai et al., 2006) (Figure 9).

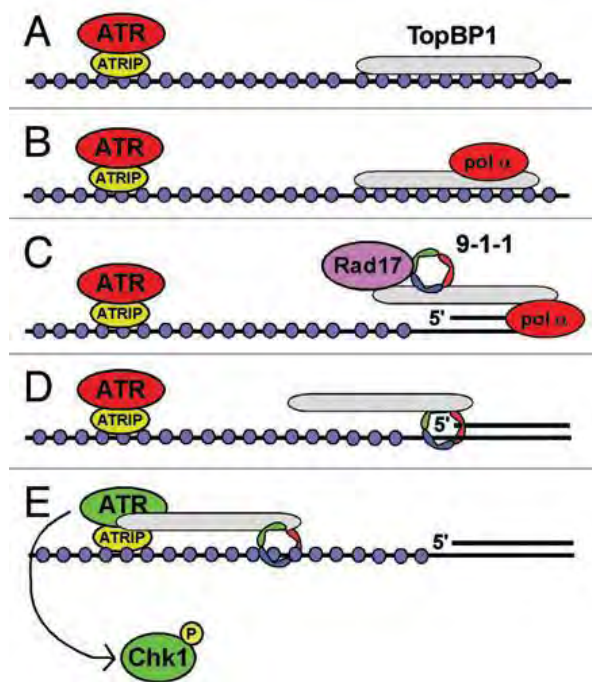


Figure 9: Modèle pour l'activation d'ATR. A. ATR-ATRIP et TopBP1 sont recrutés indépendamment au niveau de l'ADN simple-brin protégé par RPA. B. TopBP1 recrute Pol α qui synthétise une amorce. C. TopBP1 recrute 9-1-1 et Rad17-RFC à l'extrémité 5' de l'amorce et 9-1-1 est chargé sur l'ADN par Rad17-RFC. D. L'interaction entre TopBP1 et 9-1-1 persiste. E. Un complexe contenant ATR, ATRIP, TopBP1 et 9-1-1 se forme sur l'ADN simple-brin protégé par RPA et cela permet l'activation d'ATR. Yan and Michael, 2009.

Les fourches de réplication contiennent des brins en synthèse continue et discontinue. Les brins en synthèse discontinue sont synthétisés grâce à des cycles continus de synthèse d'amorces par Pol α , qui sont ensuite élongués par Pol δ (Huang et al 1999; Jin et al., 2001; Garg et al., 2004; Johansson et al., 2004; Fukui et al., 2004). Si Pol α ou Pol δ venaient à s'arrêter au niveau d'une lésion, alors l'assemblage des protéines du checkpoint aurait lieu à l'extrémité 5' du fragment d'Okazaki suivant. Sur le brin en synthèse continue, la synthèse d'amorce par Pol α est supposée avoir lieu une fois par réplicon et l'amorce est élonguée par Pol ϵ (Garg and Burgers, 2005a; Pursell et al., 2007). Si cette polymérase est stoppée par une lésion, le recrutement de Pol α par TopBP1 permettrait le redémarrage de la réplication et l'assemblage des protéines du checkpoint (Figure 10). Différentes études ont en effet montré que la réplication pourrait redémarrer en aval de la lésion sur le brin en synthèse continue chez *E.coli in vitro* (Heller and Marians, 2006). *In vivo*, il a été montré que des brèches d'ADN simple-brin se forment après l'irradiation aux UV de cellules de *S. cerevisiae* (Lopes et al., 2006).

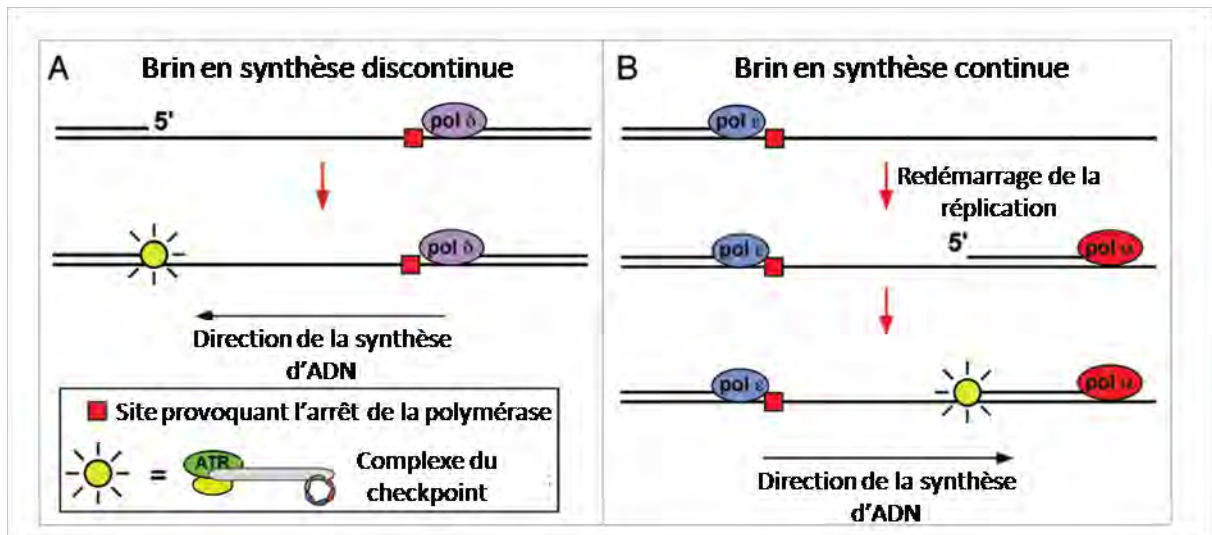


Figure 10: Modèles pour la création des jonctions 5' quand les polymérase répliquatives sont stoppées au niveau d'une lésion sur le brin en synthèse discontinue (A) ou sur le brin en synthèse continue (B). Adapté de Yan and Michael, 2009.

ATR activée phosphoryle la protéine **Claspine**, requise pour une progression normale des fourches (Katou et al., 2003; Lee et al., 2003; Osborn and Elledge, 2003; Szyjka et al., 2005; Tourriere et al., 2005; Petermann et al., 2008). La Claspine est en complexe avec **Chk1** (Yang et al., 2008) qui est alors activée grâce à une phosphorylation par ATR (Alcasabas et al., 2001).

Chk1 phosphorylée régule l'activation des origines de réplication (Santocanale and Diffley, 1998; Shirahige et al., 1998; Santocanale et al., 1999; Unsal-Kacmaz et al., 2007), **la stabilisation des fourches de réplication en réponse aux dommages de l'ADN** (Lopes et al., 2001; Tercero and Diffley, 2001) et **leur redémarrage** (Desany et al., 1998; Szyjka et al., 2008), **l'induction transcriptionnelle de gènes impliqués dans la réponse aux dommages** (Allen et al., 1994) et **l'inhibition de la mitose tant que la réplication est incomplète** (Allen et al., 1994) (Figure 11).

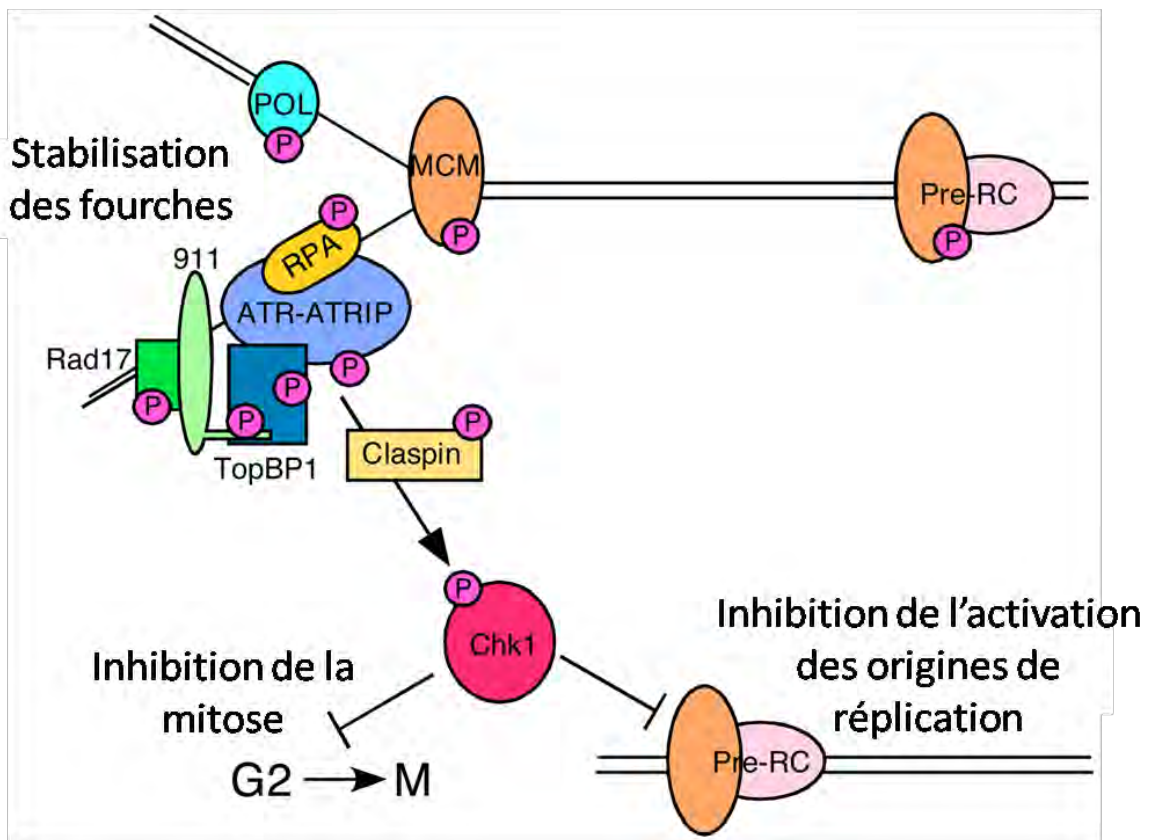


Figure 11: ATR phosphoryle de nombreux substrats pour réguler la réplication et les transitions du cycle cellulaire. Le substrat majeur d'ATR est Chk1. La phosphorylation de cette protéine permet son départ de la chromatine et augmente son activité kinase. Les cibles de Chk1 régulent les transitions du cycle cellulaire et l'activation des origines de réplication. La plupart des cibles d'ATR se trouvent dans la fourche de réplication et leur phosphorylation contribue à la stabilisation de la fourche. Adapté de Cimprich and Cortez, 2008.

C. La tolérance des dommages

Contrairement à un arrêt de la transcription, qui active une voie spécifique de réparation de l'ADN couplée à la transcription (TCR), aucun mode de réparation de l'ADN n'a été identifié comme étant spécifiquement activé par l'arrêt ou le blocage de la réplication de l'ADN. A la place, les cellules possèdent des mécanismes pour tolérer temporairement les dommages de l'ADN jusqu'à ce que les mécanismes de réparation puissent entrer en jeu.

Deux mécanismes permettent le redémarrage de la réplication chez les eucaryotes: **la réparation post-réplivative et la recombinaison homologue**. La réparation post-réplivative est contrôlée par **la voie Rad6/Rad18**. En effet, des analyses génétiques chez *S. cerevisiae* ont permis la classification des membres de ce groupe en **deux branches** (Lawrence, 1994):

- l'une infidèle comprenant les **trois ADN polymérases translésionnelles de la levure, Pol η , Rev1 et Pol δ** (Lawrence and Maher, 2001; Ohmori et al., 2001) impliquées dans la **synthèse translésionnelle**,
- l'autre fidèle comprenant les protéines **Rad5, Ubc13 et Mms2** impliquées dans le **contournement des dommages**.

En réponse aux dommages, PCNA est **mono-ubiquitiné** au niveau de la **lysine K164** par **Rad6/Rad18** (Hoege et al., 2002), et **poly-ubiquitiné** sur le même résidu par **Ubc13/Mms2 et Rad5** qui forment une chaîne d'ubiquitine via le résidu K63 de l'ubiquitine (Hoege et al., 2002) (Figure 13). **La mono-ubiquitination est requise pour la synthèse translésionnelle, et la poly-ubiquitination pour le contournement des lésions** (Figure 12).

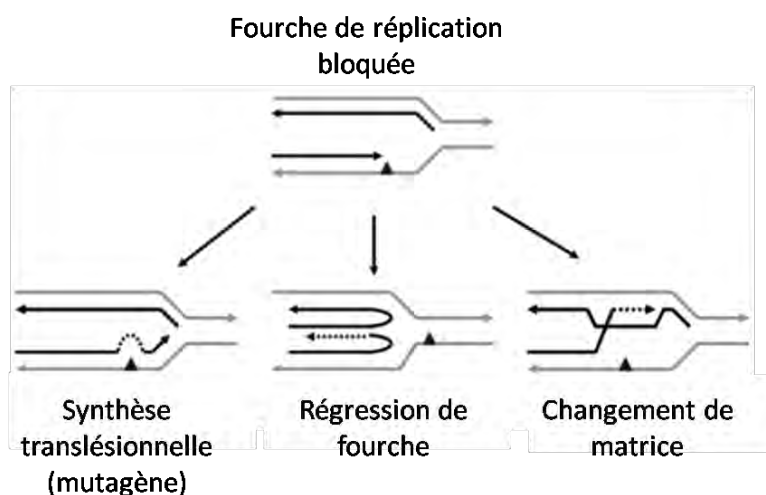


Figure 12: La réparation post-réplivative. Le triangle représente la lésion qui bloque la fourche de réplication. La synthèse translésionnelle permet la synthèse à travers la lésion et est potentiellement mutagène. Le contournement des lésions implique l'utilisation du brin fils de la chromatide sœur nouvellement synthétisée comme matrice. Deux mécanismes sont proposés: la régression de fourche ou le changement de matrice. Adapté de Andersen et al, 2008.

Chez *S. cerevisiae*, PCNA peut aussi être **sumoylé en K164** (Figure 13). Ce processus requiert le complexe **Ubc9/Siz1** (Hoege et al., 2002; Stelter and Ulrich, 2003). La SUMOylation de PCNA en K164 a lieu de manière constitutive **durant la phase S**. Elle **empêche la recombinaison homologue** d'avoir lieu en recrutant l'hélicase **Srs2**, qui détruit le filament Rad51 sur l'ADN simple-brin (Papouli et al., 2005 ; Pfander et al., 2005). On ignore s'il y a un changement entre SUMOylation et ubiquitination lorsqu' une fourche de réplication est bloquée ou si les deux modifications peuvent coexister sur un trimère de PCNA. **La SUMOylation de PCNA n'a pas été détectée chez les mammifères** ou même chez *S. pombe*. La fonction de la SUMOylation de PCNA dans les cellules DT40 de poulet et dans les extraits d'œufs de xénope est encore inconnue (Leach and Michael, 2005; Arakawa et al., 2006; Gohler et al., 2008). Chez l'homme, les membres de la famille des hélicases RecQ comme BLM et RecQL5 présentent des activités anti-recombinase (Wu and Hickson, 2006; Bugreev et al., 2007; Hu et al., 2007). Un hétérologue de Srs2, RTEL1, a récemment été identifié chez l'homme (Barber et al., 2008). Fbh1, autre hélicase présentant des similarités avec Srs2, serait l'homologue fonctionnel de Srs2 chez *S. pombe* et les eucaryotes supérieurs (Chiolo et al., 2008). Dans les cellules humaines, Fbh1 possède à la fois des activités pro et anti-recombinase, contribuant à la régulation de la production d'ADN simple-brin et de la formation des nucléofilaments de Rad51 (Fugger et al., 2009).

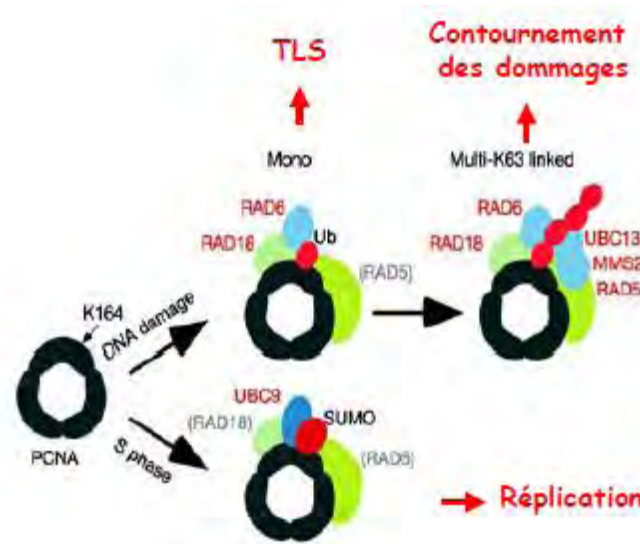


Figure 13: Les modifications post-traductionnelles de PCNA. La lysine K164 qui peut être modifiée est visualisée. En réponse aux dommages de l'ADN, PCNA est mono-ubiquitiné en K164 par Rad6/Rad18. Ubc13, Mms2 et Rad5 poly-ubiquitinent PCNA. En l'absence de dommages et en phase S, PCNA est SUMOylé en K164 par Ubc9 et Siz1. La structure de PCNA chez *S. cerevisiae* est dérivée de Krishna et al 1994. Adapté de Hoege et al., 2002.

1. Les protéines Rad6 et Rad18

Les photoproduits de l'ADN induits par les UV bloquent la machinerie répliquative. Ainsi, durant la réplication d'un génome endommagé par les UV, des brèches sont formées dans le brin d'ADN nouvellement synthétisé, en face des lésions UV. **Chez *S. cerevisiae*, la réparation post-répliquative, c'est-à-dire le comblement de ces brèches** (analysé par migration de l'ADN néo-synthétisé en gradient de sucrose alcalin), **est sous le contrôle du gène *RAD6*** (Prakash, 1981). Les mutants *rad6* sont sensibles à des agents endommageant l'ADN, présentent une perte de la mutagenèse induite par les UV, une augmentation de la fréquence des mutations spontanées et des défauts de croissance sévères (Lawrence and Christensen, 1976; Montelone et al., 1981; Lawrence and Christensen, 1982; Prakash et al., 1993). L'inactivation du site actif par la mutation de la cystéine 88 a indiqué que **l'activité de conjugaison de l'ubiquitine est essentielle pour les fonctions biologiques de Rad6** (Sung et al., 1990). *RAD6* est aussi impliqué dans un grand nombre de processus cellulaires chez la levure (dégradation des protéines, méiose, sporulation, gene silencing) (Cox and Parry, 1968; Dohmen et al., 1991; Huang et al., 1997).

Chez les mammifères, il existe **2 homologues de *RAD6*, *HR6A* et *HR6B*** (Koken et al., 1991). Ces protéines ont 70% d'identité de séquence avec *RAD6* de levure (Koken et al., 1991). Les homologues de souris mHR6A and mHR6B sont identiques à 100% aux protéines humaines hHR6A and hHR6B. Ces homologues sont capables de compléter un mutant *rad6* de levure en ce qui concerne la réparation et la mutagenèse mais pas pour la sporulation (Koken et al., 1991). Les souris mâles *HR6B*^{-/-} et femelles *HR6A*^{-/-} sont stériles mais ne présentent pas d'autres problèmes (Roest et al., 1996; Baarends et al., 2000 ; Roest et al., 2004). Les souris *HR6A*^{-/-} *HR6B*^{-/-} ne sont pas viables (Roest et al., 2004).

Comme les mutants *rad6*, les **mutants *rad18* de levure**, présentent une **sensibilité aux UV**, un **défaut de réparation post-répliquative des lésions UV** (Prakash, 1981) et un **défaut dans la mutagenèse induite par les UV** (Cassier-Chauvat and Fabre, 1991 ; Armstrong et al., 1994). Ils présentent des fréquences élevées de recombinaison spontanée, de conversion génique et de recombinaison entre des séquences répétées (Schiestl et al., 1990; Liefshitz et al., 1998).

Chez les eucaryotes supérieurs, la situation est plus complexe et il existerait une **voie de tolérance des dommages indépendante de Rad18**. En effet, les sensibilités à divers agents endommageant l'ADN diffèrent selon les lignées testées (Tableau 3). Dans les cellules DT40, Rad18 n'est pas épistatique, en terme de survie à différents produits endommageant l'ADN, avec au moins trois composants de la machinerie de TLS: Pol κ pour la survie aux UV (Okada et al., 2002), Rev1 pour la sensibilité aux UV et au cisplatine (Ross et al., 2005) et la sous-unité Rev3 de Pol δ en ce qui concerne la survie des cellules aux UV, au MMS et aux rayons X (Sonoda et al., 2003).

Tableau 3: Sensibilité de différentes lignées cellulaires Rad18^{-/-} à divers agents endommageant l'ADN.

| Sensibilité des lignées Rad18 ^{-/-} | UV | MMS | Mytomycine C | Cisplatine | Rayons X | Bibliographie |
|--|---------|---------|--------------|------------|----------|---|
| <i>S. cerevisiae</i> | oui | oui | | | oui | Prakash, 1981; Lawrence and Christensen, 1982; Fabre et al., 1989 |
| MEF | modérée | modérée | modérée | modérée | non | Tateishi et al., 2003 |
| DT40 | modérée | faible | | oui | faible | Yamashita et al., 2002, Sonoda et al., 2002 |
| HCT116 | non | oui | | oui | oui | Shiomi et al., 2007 |

En plus de son rôle dans la tolérance des dommages, Rad18 est impliquée dans la réparation des cassures simple-brin (Nakajima et al., 2006; Shiomi et al., 2007) et double-brin de l'ADN (Yoshimura et al., 2006; Szuts et al., 2006; Saberi et al., 2007; Huang et al., 2009; Inagaki et al., 2009; Watanabe et al., 2009).

Chez *S. cerevisiae*, le complexe Rad6/Rad18 catalyse non seulement la mono-ubiquitination de PCNA mais aussi celle de la sous-unité Rad17 de l'anneau 9-1-1. Ceci permet l'induction de la transcription de nombreux gènes et l'activation des checkpoints en

réponse à des dommages de l'ADN dus au MMS (Fu et al., 2008). **Rad6/Rad18 pourrait donc coordonner la réponse cellulaire aux dommages de l'ADN, incluant la tolérance des dommages via PCNA, l'induction du checkpoint via 9-1-1 et la régulation transcriptionnelle de gènes cibles.** Cependant, on ignore si un tel mécanisme pourrait être à l'œuvre chez les eucaryotes supérieurs (Figure 14).

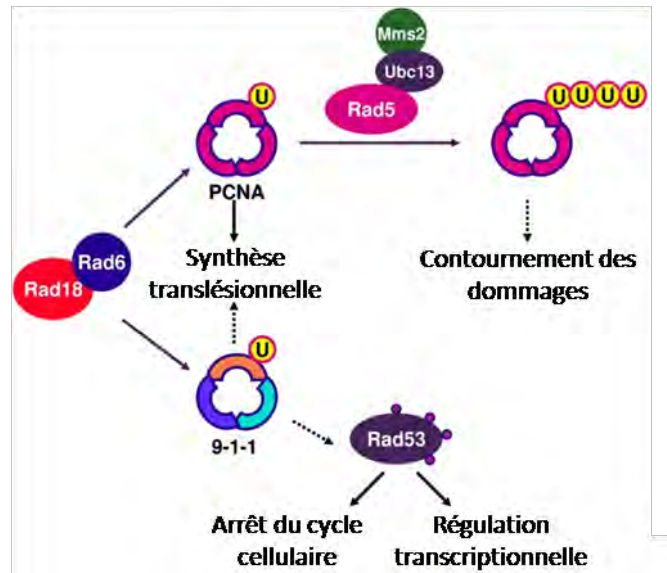


Figure 14: Modèle présentant la régulation coordonnée de la tolérance des dommages par la mono-ubiquitination de PCNA et de 9-1-1 par le complexe Rad6/Rad18 chez *S. cerevisiae*. PCNA mono-ubiquitiné et peut être 9-1-1 recrutent les polymérases translésionnelles pour franchir des lésions de l'ADN. PCNA peut être poly-ubiquitiné par le complexe Rad5-Ubc13-Mms2 tandis que 9-1-1 mono-ubiquitiné active le checkpoint menant à la phosphorylation de Rad53, ce qui résulte en une régulation transcriptionnelle et un arrêt du cycle cellulaire. Les flèches en pointillés indiquent les mécanismes mal définis du point de vue moléculaire. Adapté de Fu et al, 2008.

2. Le système d'ubiquitination

L'ubiquitination d'une protéine requiert la coordination et l'association de plusieurs enzymes. Trois classes différentes d'enzymes sont impliquées: une **enzyme E1** (ubiquitin-activating enzyme); une **enzyme E2** (ubiquitin-conjugating enzyme) et une **ubiquitine ligase E3**.

L'ubiquitine comporte 76 acides aminés et a une masse moléculaire d'environ 8500 Da. Sa structure est très conservée parmi les différentes espèces d'eucaryotes : l'ubiquitine humaine et celle de levure partagent 96 % d'identité pour leur séquence protéique. Le génome humain code pour 8 enzymes E1, 40 enzymes E2 différentes et plus de 500 ligases E3 différentes. Les mammifères possèdent 90 enzymes de dé-ubiquitination (DUB) pour cliver spécifiquement les chaînes de poly-ubiquitines ou enlever l'ubiquitine des protéines cibles. Le nombre de protéines reconnaissant l'ubiquitine est difficilement chiffrable. Dans la majorité

des cas, ces protéines possèdent des domaines UBD (ubiquitin-binding domain) (revue: Hofmann, 2009).

L'ubiquitine est **activée** lors d'une réaction en deux temps **par l'enzyme d'activation E1**, avec l'ATP comme source d'énergie. L'ubiquitine est adénylée en C-terminal puis la cystéine du site actif de E1 attaque cet intermédiaire pour former la forme activée du **complexe ubiquitine-E1**. L'ubiquitine est ensuite **transférée** dans le site actif d'**E2**. E2 **interagit avec E3** qui reconnaît la protéine cible. **E3 transfère** l'ubiquitine sur la cible. La conjugaison a lieu grâce à la formation d'un pont entre la glycine de l'ubiquitine et le groupe ϵ -amino de la lysine de la cible. Les protéines mono-ubiquitinées peuvent subir plusieurs cycles d'ubiquitination pour former des chaînes d'ubiquitines ou peuvent être dé-ubiquitinées par les DUB (Figure 15).

Rad6 et Ubc13/Mms2 sont des enzymes de type **E2**, tandis que **Rad18, Rad5 et HLTF et SHPRH** (homologues de Rad5 chez l'homme) sont des **E3** (Figure 15).

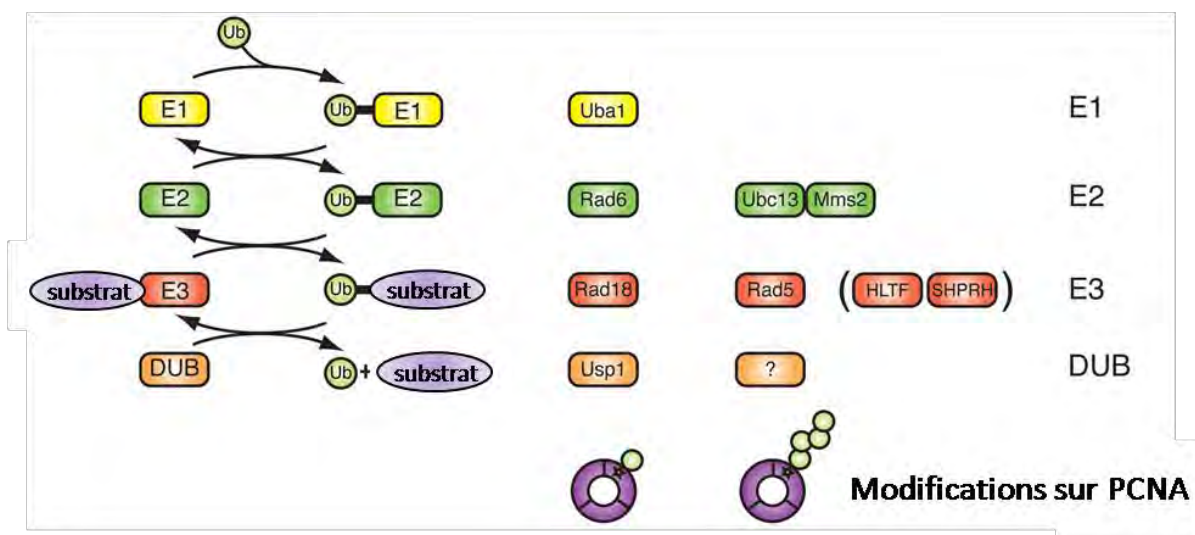


Figure 15: Le système d'ubiquitination et les enzymes impliquées dans l'ubiquitination de PCNA. L'ubiquitination dépend de trois réactions concertées. E1 interagit avec l'ubiquitine (liaison dépendante de l'ATP). L'ubiquitine est ensuite transférée dans le site actif d'E2 (cystéine). E2 interagit avec E3 qui apporte la protéine cible. E3 transfère l'ubiquitine sur la cible. Les enzymes responsables de la mono- et poly-ubiquitination sont indiqués. Entre parenthèses, les homologues humains de Rad5 sont cités. E2: enzyme de conjugaison de l'ubiquitine. E3: ubiquitine ligase. Ub: ubiquitine. DUB: dé-ubiquitinase. Adapté de Chang and Cimprich, 2009.

3. Les modifications post-traductionnelles de PCNA

a. Généralités sur PCNA

Proliferating Cell Nuclear Antigen ou PCNA appartient à la famille des « DNA sliding clamps » qui sont structurellement et fonctionnellement conservés au cours de

l'évolution. Ils forment des complexes en anneau (homodimères pour les eubactéries, **homotrimères pour les eucaryotes** et le bactériophage T4, hétérotrimères pour les archae) qui encerclent l'ADN et sont capables de « glisser » dans les deux directions. Les monomères de PCNA possèdent **deux domaines similaires reliés par une boucle**, appelée « **interdomain connecting loop** » (**IDCL**) (Figure 16).

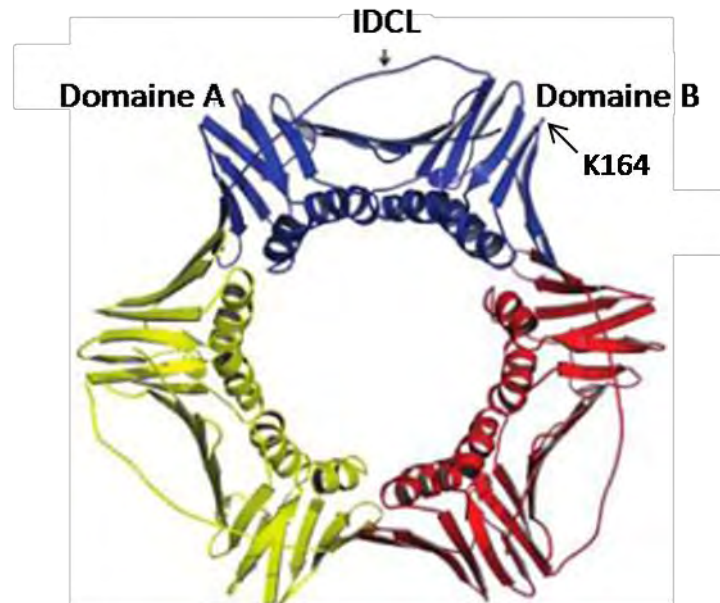


Figure 16: Structure de PCNA. Chaque monomère de PCNA est de couleur différente (jaune, bleu, rouge). Le domaine IDCL et les deux domaines A et B sont indiqués sur l'une des sous-unités. La position du résidu K164 est indiquée sur l'un des monomères. Adapté de Freudenthal et al, 2008.

La surface interne de l'anneau est de charge positive et est composée par des hélices α qui interagissent avec l'ADN. La surface externe de l'anneau est composée de feuillettes β . PCNA est chargé autour de l'ADN par le complexe RFC au niveau de l'extrémité 3'OH d'une jonction matrice/amorce (Majka et Burgers, 2004). Le chargement de PCNA est orienté ce qui permet de discriminer le brin parental et le brin nouvellement synthétisé lors de la réparation des mésappariements. L'anneau PCNA, qui encercle l'ADN, est un **co-facteur essentiel pour la synthèse processive de l'ADN**. De plus, cette protéine est une **plateforme d'interaction pour de nombreux facteurs qui agissent pendant la réplication, la réparation, la régulation du cycle cellulaire et l'assemblage et le remodelage de la chromatine** (Tableau 4). Le **motif PIP** (PCNA-interacting peptide) est présent dans la plupart des protéines qui interagissent avec PCNA (Tableau 4). Sa séquence est **QxxLxxFF**.

Tableau 4: Liste non exhaustive des protéines interagissant avec PCNA. PCNA interagit avec de nombreuses protéines impliquées dans différents mécanismes cellulaires. Les protéines en gras contiennent un domaine d'interaction avec PCNA appelé PIP. Adapté de Moldovan et al 2007.

| Activités | Protéines |
|--|--|
| ADN polymérase | Polδ, Polϵ, Polη, Polι, Polκ, Polδ, Polλ, Polβ, Rev1 |
| ADN ligase | ADN ligase I |
| Topoisomérase | TopoIIα |
| Ubiquitine ligases E3 | Rad18, Rad5 |
| Enzyme de conjugaison SUMO E2 | Ubc9 |
| Hélicases, ATPases | Srs2, Rrm3 , Mgs1, WRN, RECQ5 |
| Enzymes de réparation des mésappariements | Msh3, Msh6, Mlh1 , EXO1 |
| Enzyme impliquée dans NER | XPG |
| Facteur d'assemblage de la chromatine | CAF-1 |
| DNA méthyltransférase | DNMT1 |
| Facteurs de cohésion des chromatides sœurs | Eco1, Chl1 , Ctf18 |
| Kinase | CDK2 |
| Régulateurs du cycle cellulaire | p21, p57 , cycline D1 |
| Facteurs apoptotiques | Gadd45, ING1b, p53 |
| Clamp loader | Rfc1, Rfc3 , Rfc4 |
| Flap-endonucléase | FEN-1 |
| Enzymes du BER | UNG2, MPG, NTH1, hMYH, APE1, APE2, XRCC1 |

b. La mono-ubiquitination de PCNA

Le signal de la mono-ubiquitination de PCNA

PCNA est ubiquitiné dans les cellules humaines et de levure exposées ou traitées aux **ultra-violet (UV), au méthyl méthanesulfonate (MMS), à la mitomycine C (MMC) et à l'hydroxyurée (HU)** mais pas dans celles traitées à la bléomycine ou la camptothécine (Hoegge et al., 2002 ; Stelter and Ulrich, 2003 ; Shiomi et al., 2007; Niimi et al., 2008; Davies et al., 2008), à la daunomycine, à l'actinomycine D ou la néocarzinostatine (Soria et al., 2006). En ce qui concerne les radiations ionisantes, la réponse varie suivant les organismes : ces traitements induisent clairement la modification de PCNA chez *S. cerevisiae* et *S. pombe* (Frampton et al., 2006; Davies et al., 2008) mais pas dans les cellules de mammifères (Kannouche et al., 2004).

Les rayons ultra-violet, le MMS provoquent un arrêt de la fourche de réplication, la dissociation de l'hélicase de la machinerie réplivative et **l'exposition d'ADN simple-brin en aval de la lésion** (Lopes et al., 2006). L'hydroxyurée est à l'origine d'une inhibition de la désoxyribonucléotide réductase, ce qui stoppe aussi la progression des fourches mais ne provoque pas de dommages sur l'ADN. Par contre, les radiations ionisantes, la bléomycine et la néocarzinostatine génèrent des cassures double-brin et la modification de PCNA n'est nullement détectée dans ces cas. La camptothécine, inhibiteur de topoisomérase, cause un arrêt des fourches de réplication et des cassures de l'ADN en affectant le mouvement du réplisome en son entier, y compris l'hélicase (Liu et al., 2000). Il n'y a donc pas, dans ce cas, de découplage entre le mouvement de l'hélicase et celui de la polymérase et en conséquence pas d'exposition d'ADN simple-brin. **Ce serait donc l'ADN simple-brin généré par le découplage entre l'activité de l'hélicase et celle de la polymérase lorsque la fourche de réplication est bloquée qui servirait de signal pour la mono-ubiquitination de PCNA.**

Pourtant, la modification de PCNA peut être observée en dehors de la phase S, notamment chez *S. cerevisiae* en G1 en réponse à la formation de pontages inter-brin par l'azote moutarde (HN₂) (Sarkar et al., 2006). Ces pontages seraient réparés par le mécanisme d'excision de nucléotides (NER) en combinaison avec la TLS (McHugh et al., 2000). Selon ce modèle, les enzymes du mécanisme NER réalisent l'excision sur l'un des brins, l'autre portant toujours la lésion. Lors de la synthèse de l'ADN qui suit l'excision, la polymérase réplivative

est bloquée, PCNA est mono-ubiquitiné (McHugh et al., 2000; McHugh and Sarkar, 2006; Sarakar et al., 2006) et une ADN polymérase translésionnelle est recrutée pour franchir la lésion (Sarkar et al., 2006) (Figure 17). Un tel modèle expliquerait pourquoi un traitement des cellules à la mitomycine C induit la modification de PCNA (Niimi et al., 2008).

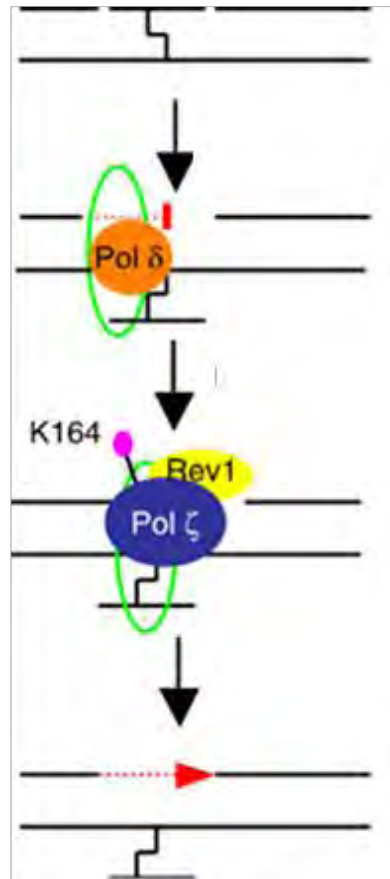


Figure 17: Modèle expliquant les rôles de NER, la modification de PCNA et Pol ζ dans la réparation des pontages intra-brin en phase G1 du cycle cellulaire. La première étape est effectuée par les enzymes du NER qui réalisent l'excision sur l'un des brins, l'autre portant toujours la lésion. Le comblement de la brèche d'ADN simple-brin est accompli par la polymérase répliquative jusqu'à ce qu'elle soit bloquée au niveau de l'oligonucléotide ponté. PCNA (cercle vert) est alors mono-ubiquitiné et la polymérase translésionnelle Pol ζ est alors recrutée pour franchir la lésion. Adapté de Sarkar et al, 2006.

Implication de RPA et des protéines du réplisome

In vivo, l'ADN simple-brin est rapidement recouvert par la protéine de répllication A (RPA), hétérotrimère qui stabilise l'ADN simple-brin (Iftode et al., 1999 ; Fanning et al., 2006 ; Zou et al., 2006). L'analyse de la déplétion de cette protéine chez *S.cerevisiae* a montré que RPA est requise pour l'ubiquitination de PCNA (Davies et al., 2008). Des études précédentes avaient suggéré une réduction modérée de cette modification dans les cellules humaines traitées avec des siRNA anti RPA2 (Bi et al., 2006), mais une analyse plus récente a confirmé le besoin de RPA chez les mammifères (Niimi et al., 2008

PNAS). Des **interactions physiques directes entre Rad18 et deux des sous-unités de RPA, Rfa1 et Rfa2**, ont été démontrées par double hybride, co-immunoprécipitation et expériences de pull-down *in vitro* chez *S. cerevisiae* (Davies et al., 2008). La **conservation de cette interaction chez les mammifères** a été confirmée par co-immunoprécipitation (Davies et al. Mol cell, 2008). Ces expériences ont mené à la proposition d'un modèle où le recrutement de Rad6/Rad18 aux fourches de réplication bloquées grâce à une interaction physique avec RPA permet l'ubiquitination de PCNA (Davies et al., 2008 ; Huttner and Ulrich, 2008) (Figure 18).

RPA liée à l'ADN simple-brin est aussi impliquée dans l'activation du checkpoint de la réplication (Cobb et al., 2004; Branzei and Foiani, 2005) (Figure 18).

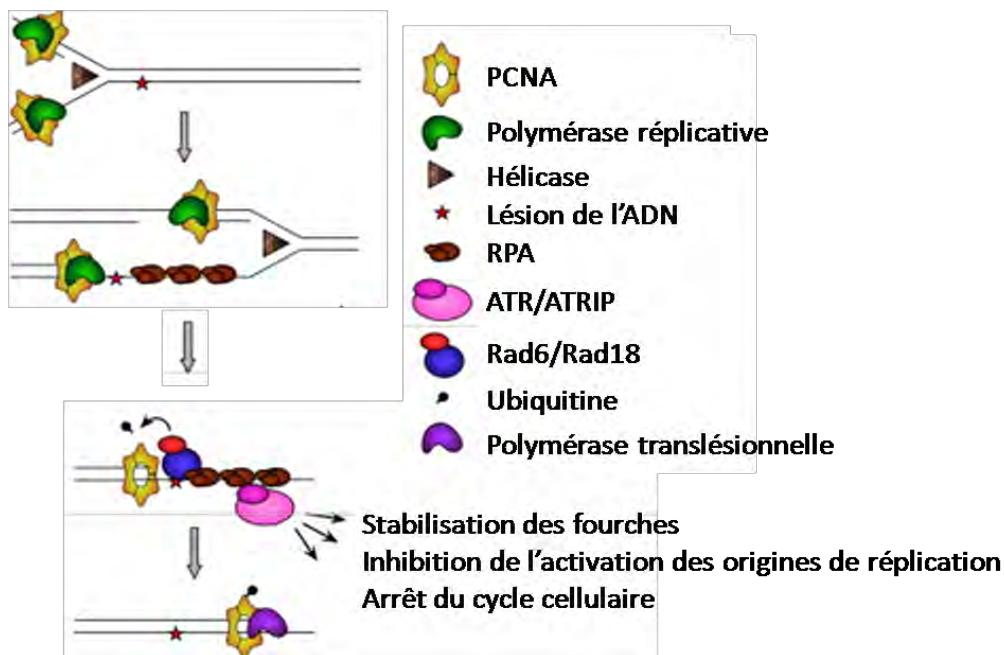


Figure 18: Modèle expliquant le rôle de RPA dans la TLS et dans l'activation du checkpoint de la réplication. Les lésions de l'ADN en cours de réplication causent une séparation entre l'hélicase et la polymérase répliquative, menant à l'exposition d'ADN simple-brin. Le complexe ADN simple-brin/RPA est à l'origine du recrutement d'ATR/ATRIP pour l'activation du checkpoint et du complexe Rad6/Rad18 pour l'ubiquitination de PCNA. PCNA mono-ubiquitiné recrute alors les polymérases translésionnelles pour le franchissement de la lésion. Adapté de Ulrich, 2009.

L'activation d'ATR et la mono-ubiquitination de PCNA sont deux mécanismes indépendants chez *S. cerevisiae* (Davies et al., 2008), *S. pombe* (Frampton et al., 2006) et **dans les extraits d'œufs de *Xenopus laevis*** (Chang et al., 2006). En effet, chez *S. cerevisiae* et *S. pombe*, l'ubiquitination de PCNA en réponse à un traitement au MMS n'est pas affectée dans des mutants du checkpoint de la réplication (gènes *tell*, *mecl1*; *chk1*, *rad9* ou *rad17*) et le checkpoint de la réplication est activé normalement en réponse à un traitement à l'hydroxy-urée, au MMS ou aux UV dans des souches déficientes pour la mono-ubiquitination de PCNA (Frampton et al., 2006; Davies et al., 2008;). Dans les extraits d'œufs de xénope, l'inhibition du checkpoint par la caféine et l'immunodéplétion d'ATRIP, de Rad1 n'ont pas d'effet sur la

mono-ubiquitination de PCNA en réponse à un traitement avec l'aphidicoline ou aux UV (Chang et al., 2006).

Dans les cellules humaines, une première expérience a montré une petite réduction de l'ubiquitination de PCNA en réponse à l'extinction d'ATR par interférence à ARN dans les cellules traitées au BPDE (benzo[a]pyrene dihydrodiol epoxide) (Bi et al., 2006). Cependant, une publication plus récente n'a pas permis de reproduire l'effet de la déplétion d'ATR (Niimi et al., 2008). L'activité kinase de Chk1, la cible majeure d'ATR, n'est pas nécessaire pour l'ubiquitination de PCNA (Yang et al., 2008).

Néanmoins, une publication rapporte que des membres actifs du checkpoint, soit **Chk1, la Claspine, Timeless, Tipine**, à l'exception d'ATR, **sont nécessaires pour la mono-ubiquitination** (Yang et al., 2008). En effet, Chk1 renforce la mono-ubiquitination de PCNA en stabilisant la protéine du réplisome **Claspine**. Sans cette protéine, le recrutement de Rad18 sur la chromatine est sensiblement diminué (même en l'absence de dommages) (Yang et al., 2008). De plus, la Claspine, Timeless et Chk1 interagissent avec PCNA (Yang et al., 2008; Scolah et al., 2008) et pourraient faciliter le recrutement de Rad18 en donnant au réplisome bloqué une configuration adéquate pour l'activité de Rad18. En effet, Mrc1 et Tof1 (homologues de Claspine et Timeless dans la levure) sont nécessaires pour le maintien des fourches de réplication bloquées (Katou et al., 2003).

Enfin, Tipine, protéine associée à Timeless, se lie à RPA (Gotter et al., 2007; Unsal-Kacmaz et al., 2007). Le complexe Tipine-RPA-ADNss pourrait être important pour le recrutement de Rad18.

Chk1, la Claspine, Timeless et Tipine constitueraient donc un module fonctionnel au niveau de la fourche de réplication. En effet, à travers ses interactions avec RPA lié à l'ADN simple-brin et avec PCNA, ce module jouerait **un double rôle, dans l'ubiquitination de PCNA et dans le signalement du checkpoint d'ATR** (Yang and Zou, 2009) (Figure 19).

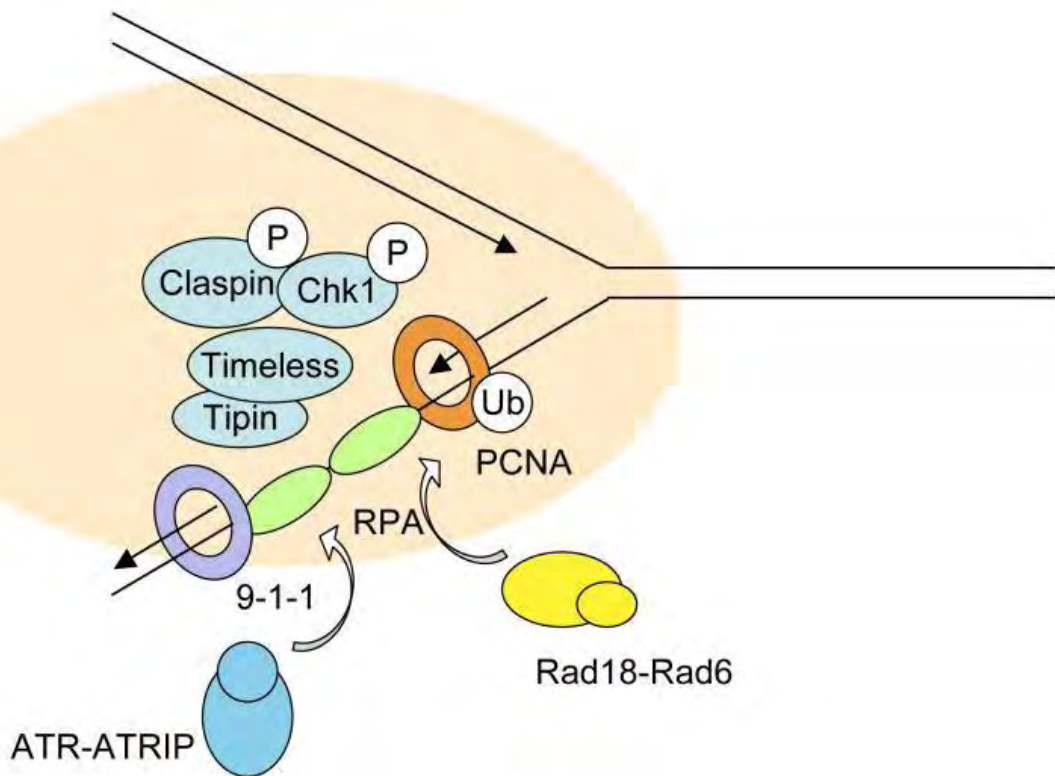


Figure 19: Représentation schématique des protéines impliquées dans la mono-ubiquitination de PCNA au niveau d'une fourche de réplication de l'ADN. Chk1, Claspine, Timeless et Tipine constituent un complexe fonctionnel au niveau des fourches de réplication. A travers leurs interactions avec RPA, 9-1-1 et PCNA, ce complexe serait impliqué à la fois dans l'activation du checkpoint et dans la mono-ubiquitination de PCNA par Rad6/Rad18. Issu de Yang et Zou, 2009.

Régulation de la mono-ubiquitination de PCNA par USP1

L'ubiquitination de PCNA est régulée par la dé-ubiquitinase USP1, qui est capable d'enlever l'ubiquitine de PCNA (Huang et al., 2006). En effet, **après l'irradiation aux UV des cellules MRC5, USP1 n'est plus détecté durant toute la période de persistance de PCNA ubiquitiné** (Huang et al., 2006). Deux mécanismes pourraient être impliqués: une inhibition de la transcription de son ARN messenger (Cohn et al., 2007) et une protéolyse (Huang et al., 2006).

Par contre, après un traitement à l'hydroxyurée (HU), à la mitomycine C (MMC), ou au MMS, l'ubiquitination de PCNA est toujours visible 24, 48 ou 72 heures respectivement après le traitement mais n'est pas accompagnée par une perte de USP1 (Niimi et al., 2008). USP1 interagit avec la protéine **UAF1** qui est requise pour son activité (Cohn et al., 2007). Un traitement à l'hydroxyurée pourrait entraîner la perte de cette interaction. La protéine **ELG1**, qui s'associe aux quatre petites sous-unités de RFC pour former un facteur de chargement de PCNA (Aroya and Kupiec, 2005), serait impliquée dans la régulation de la mono-ubiquitination de PCNA. D'une part, son absence est à l'origine de l'accumulation de PCNA

mono-ubiquitiné et sa surproduction entraîne une diminution de la modification. ELG1 interagit avec le complexe USP1-UAF1 et avec PCNA, suggérant un rôle d'ELG1 dans l'association de USP1-UAF1 à son substrat (Lee et al., 2010).

p21

La protéine p21 (aussi connu sous le nom de CDKN1A ou p21^{Cip/Waf1}), membre de la famille des inhibiteurs des CDK (cyclin-dependent kinase) interagit avec PCNA et inhiberait ses fonctions (Warbrick, 1998; Bruning and Shamo, 2004;). *In vitro*, p21 empêche l'interaction entre PCNA et RFC (Oku et al., 1998), l'ADN polymérase δ (Waga et al., 1994; Produst et al., 1995), FEN1 (Chen et al., 1996) et différents facteurs requis pour NER (Gary et al., 1997). *In vivo*, un rôle de p21 dans NER est controversé, certains groupes mettant en évidence un rôle inhibiteur dans l'étape de synthèse lors du mécanisme de réparation NER (Cooper et al., 1999; Bendjennat et al., 2003), tandis que dans d'autres études, p21 aurait un effet positif ou ne serait pas du tout impliquée dans NER (McDonald et al., 1996; Sheikh et al., 1997; Smith et al., 2000; Perucca et al., 2006; Soria et al., 2008).

p21 serait impliquée dans la **régulation de la mono-ubiquitination de PCNA en réponse à un traitement des cellules aux UV**. En effet, p21 est rapidement protéolysée après UV (Lee et al., 2006; Soria et al., 2006; Kaur et al., 2007) et une forme sabilisée de la protéine inhibe la mono-ubiquitination de PCNA (Soria et al 2006). La protéolyse de p21 serait alors requise pour la modification de PCNA après un traitement aux UV (Soria et al., 2006; Avkin et al., 2006; Livneh, 2006). Trois études ont montré que l'ubiquitine ligase CRL4^{CDT2} est impliquée dans la dégradation de p21 après un traitement aux UV (Abbas et al., 2008; Nishitani et al., 2008; Kim et al., 2008). Le recrutement de cette ligase nécessiterait l'interaction de sa cible avec PCNA dans la chromatine (Arias and Walter, 2006; Havens and Walter, 2009). Selon le modèle proposé par Soria et Gottifredi, l'arrêt de la fourche de réplication au niveau d'une lésion de l'ADN serait le signal de la dégradation de p21. CRL4^{CDT2} est recrutée et poly-ubiquitine p21 menant à sa protéolyse et permettant alors la mono-ubiquitination de PCNA (Soria and Gottifredi, 2010) (Figure 20).

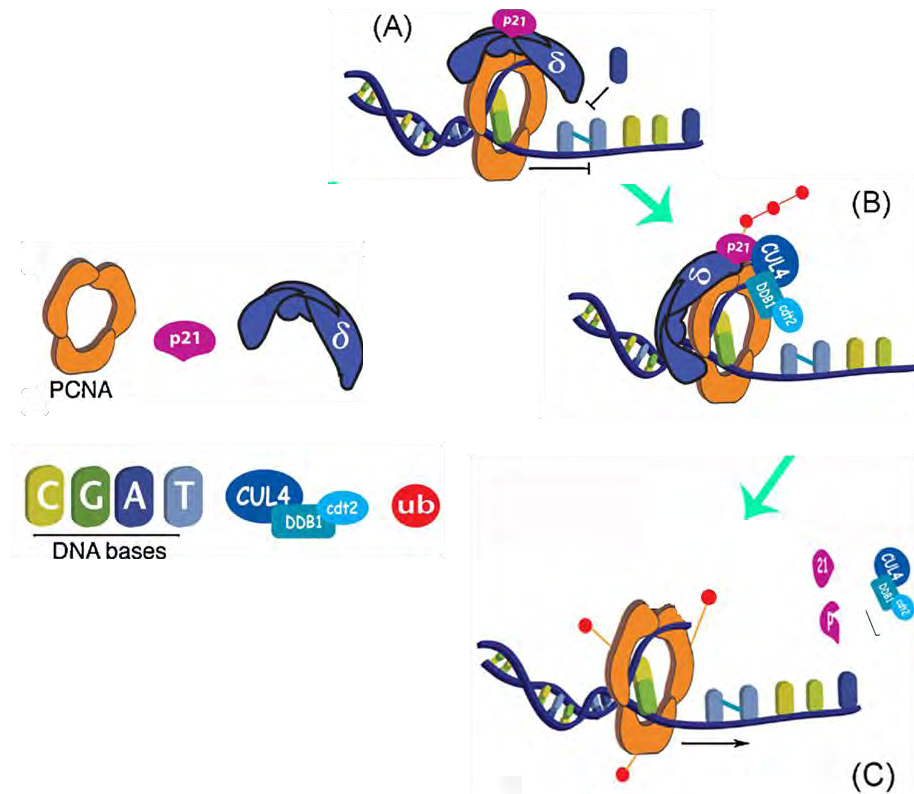


Figure 20: Régulation de la mono-ubiquitination de PCNA par la dégradation de p21. **A.** Une fourche de réplication est bloquée au niveau d'un dimère de thymine. p21 et la polymérase répliquative pouvaient jusqu'alors coexister (Soria et al 2008). **B.** Le complexe CRL4^{Cdt2} est recruté et ubiquitine p21. **C.** La dégradation de p21 permet la mono-ubiquitination de PCNA. Adapté de Soria et Gottifredi, 2010.

c. La poly-ubiquitination de PCNA

Ubc13/Mms2 et Rad5 sont impliqués dans un mécanisme de tolérance des dommages fidèle et distinct de la TLS. Chez *S. cerevisiae*, Ubc13 est épistatique avec Mms2 en terme de sensibilité aux UV (Brusky et al., 2000). De plus, chez les mutants *rad5Δ*, *ubc13Δ* ou *mms2Δ*, la mutagenèse spontanée et induite par des dommages augmente (Johnson et al., 1992; Broomfield et al., 1998; Brusky et al., 2000). Chez l'homme, la réduction de l'expression de MMS2 double la fréquence de la mutagenèse induite par les UV (Li et al., 2002). L'inhibition de la formation de la chaîne d'ubiquitine entraîne un résultat similaire (Chiu et al., 2006). La mutagenèse augmente aussi de deux à trois fois en l'absence de SHPRH et HLTF (homologues de Rad5) dans les cellules humaines (Motegi et al., 2008).

SHPRH (SNF2 histone linker PHD RING helicase) a récemment été identifiée en tant qu'homologue putatif de Rad5 chez les mammifères (Motegi et al., 2006; Unk et al., 2006). Comme Rad5, SHPRH interagit physiquement avec Rad6/Rad18 et Ubc13/Mms2 (Motegi et al., 2006) et est requis pour la poly-ubiquitination de PCNA en K164 avec Rad18 *in vivo*

(Motegi et al., 2006) et *in vitro* (Unk et al., 2006). De plus, la réduction de son expression par knockdown accroît la sensibilité aux dommages et l'instabilité génomique.

HLTF (helicase-like transcription factor) a aussi été identifiée comme un homologue de Rad5 (Motegi et al., 2008; Unk et al., 2008). Cette protéine contient un domaine HIRAN qui fonctionnerait comme senseur des dommages de l'ADN et/ou comme initiateur de la réparation (Iyer et al., 2006). Rad5 possède lui aussi un tel domaine, ce qui n'est pas le cas de SHPRH. HLTF interagit physiquement avec PCNA, Rad6/Rad18 et Ubc13/Mms2 et est impliquée dans la poly-ubiquitination de PCNA en K164 comme SHPRH (Motegi et al., 2008). HLTF et SHPRH interagissent l'un avec l'autre (Motegi et al., 2008).

La régulation entre la mono- et la poly-ubiquitination de PCNA n'est pas claire. Chez le Xénope, la poly-ubiquitination de PCNA est observée lorsque le taux de dommages de l'ADN est important (Chang et al., 2006; Motegi et al., 2008). Dans différentes lignées cellulaires humaines, la poly-ubiquitination de PCNA est détectée après un traitement au cisplatine, MMS, BPDE et UV mais pas après un traitement aux rayons X (Brun et al. 2010). Chez la levure, il a été montré que **Rad18 et Rad5 interagissent grâce aux domaines impliqués pour leur homodimérisation** (Ulrich and Jentsch, 2000). Il a alors été proposé que **l'interaction entre ces deux protéines pourrait coordonner le passage de la mono- vers la poly-ubiquitination de PCNA** (Ulrich and Jentsch, 2000) (Figure 21).

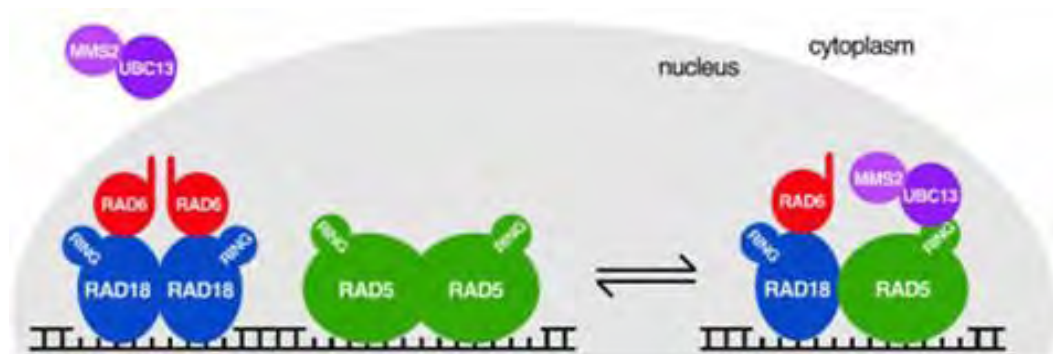


Figure 21: Compétition entre l'homodimérisation et l'hétérodimérisation de Rad18 et Rad5. Le taux de Rad18 lié à l'ADN simple-brin/RPA pourrait affecter la liaison de Rad5 avec Rad18. Plus il y a d'ADN simple-brin, plus il y a d'interactions possibles entre Rad18 et RPA et donc moins de possibilités d'homodimérisation pour Rad18. Rad5 a alors plus de chance d'interagir avec Rad18 et donc de promouvoir le contournement des lésions par rapport à la TLS. Adapté de Ulrich and Jentsch, 2000.

Bien qu'il ait été montré que HLTF et SHPRH interagissent avec Rad18 (Unk et al., 2006; Motegi et al., 2006; Unk et al., 2008; Motegi et al., 2008) et que au moins SHPRH peut interagir avec lui-même (Motegi et al., 2006), d'autres études sont nécessaires pour savoir si ce mécanisme pourrait avoir lieu de la même manière chez l'homme.

S'il est clair que les protéines dont nous avons parlé sont à l'origine de l'activation d'un mécanisme fidèle de tolérance des dommages, les protéines participant par la suite sont largement inconnues. Le besoin de Rad52 (Gangavarapu et al., 2007) et la nature fidèle de ce

processus ont suggéré des **parallèles avec la recombinaison homologue**. Il est proposé que le brin fils du brin complémentaire soit utilisé comme matrice. Deux modèles existent. L'un implique **une régression de la fourche bloquée et la formation d'une structure dite en "chicken foot"** (Postow et al., 2001), une structure à 4 voies dans laquelle l'ADN endommagé n'est plus utilisé pour la synthèse et est remplacé par le brin nouvellement synthétisé de la chromatide sœur. Quand la synthèse a été assez longue pour dépasser le dommage, on retourne à une structure de fourche normale (Figure 22). Les détails de formation et de résolution des structures en "chicken foot" chez les procaryotes et les eucaryotes ne sont pas connus. Bien que les régressions de fourches aient été observées au microscope électronique chez la levure, on ne sait pas si ces structures sont atypiques ou sont des intermédiaires habituels lors du template switching (Cotta-Ramusino et al., 2005; Lopes et al., 2006). Cependant, chez la levure, Rad5 possède une activité hélicase qui pourrait faciliter la régression de fourche (Blastyak et al., 2007). L'autre mécanisme implique **l'invasion par le brin fils homologue, la synthèse et la résolution de la jonction de Holiday formée** (Figure 22).

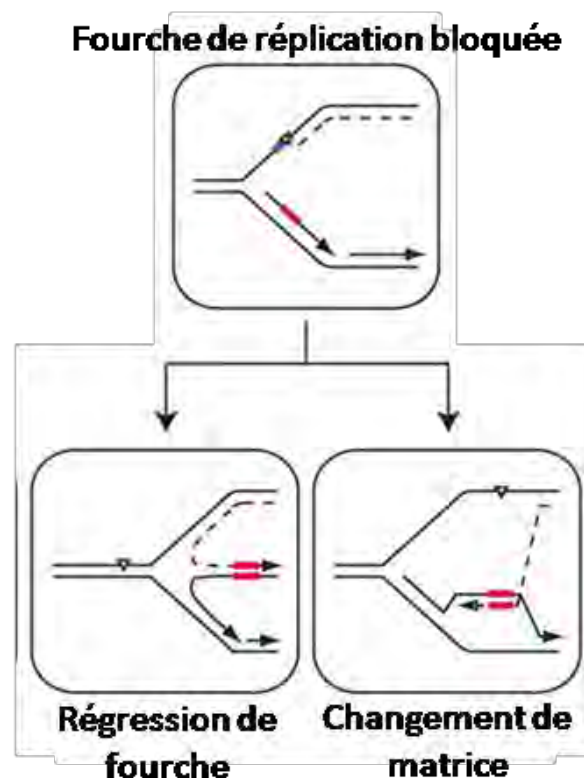


Figure 22: Le contournement des dommages. Les lésions sur l'ADN (triangle jaune) bloque la réplication (ligne en pointillé). Le mécanisme de contournement des dommages permet le franchissement des lésions en utilisant le brin fils homologue comme matrice. Deux modèles sont proposés. La régression de fourche implique la formation d'une structure dite en "chicken foot" (à gauche), tandis que l'autre mécanisme implique l'invasion par le brin fils homologue, la synthèse et la résolution de la jonction de Holiday formée (droite). Adapté de Chang and Cimprich, 2009.

d. Mono-ubiquitination de PCNA indépendante de Rad18

Dans les DT40, en absence de Rad18, la mono-ubiquitination de PCNA n'est pas entièrement abolie après un traitement au MMS, indiquant qu'une autre enzyme pouvait ubiquitiner PCNA (Simpson et al., 2006).

Une étude a montré que **CRL4^{Cdt2}** (ligase E3) (membre de la famille cullin-RING qui poly-ubiquitine Cdt1 entraînant sa dégradation) (Arias and Walter, 2006; Higa et al., 2006; Senga et al., 2006) **mono-ubiquitine PCNA en K164 dans certaines lignées cellulaires humaines en prolifération**. La mono-ubiquitination de PCNA par cette enzyme serait régulée par l'action de la dé-ubiquitinase USP1. L'inactivation de cette enzyme est à l'origine d'une baisse de l'activité de TLS dans les cellules non endommagées, ce qui indique que cette enzyme régulerait la TLS associée à des stress accompagnant la réplication de l'ADN. De plus, en réponse à des dommages de l'ADN dus aux UV ou à l'hydroxyurée, la déplétion de cette enzyme affecte aussi la mono-ubiquitination de PCNA de certaines lignées cellulaires humaines à l'exception des cellules HeLa, en retardant l'apparition de PCNA ubiquitiné de plusieurs heures.

Une autre étude a montré que la déplétion de l'ubiquitine ligase **RNF8** dans les cellules humaines A549, cellules épithéliales dérivées d'un carcinome humain, supprime la mono-ubiquitination de PCNA en réponse aux UV ou à un traitement au MNNG. De plus, RNF8 mono- et poly-ubiquitine PCNA *in vitro*. Le rôle exact de RNF8 dans la modification de PCNA pourrait être redondant avec celui de Rad18. RNF8 pourrait aussi jouer un rôle en amont, par exemple dans l'assemblage des protéines au niveau des fourches de réplication bloquées (Zhang et al., 2008).

Chez *S. cerevisiae*, la **lysine 107** de PCNA est aussi une cible de la poly-ubiquitination par Mms2 (E2) et Ubc4 et Rad5 (E3). Cette modification est essentielle pour la survie des cellules déficientes pour l'ADN ligase I dont le rôle est de liguer les fragments d'Okazaki (Ellenberger and Tomkinson, 2008). L'ubiquitination de PCNA en réponse à une déficience de ligase I existe également chez l'homme mais la lysine cible est pour le moment inconnue. **L'ubiquitination de PCNA pourrait être un code qui permet aux cellules de distinguer les différents types de défauts durant la réplication de l'ADN** (Das-Bradoo et al., 2010).

2. La synthèse translésionnelle (TLS)

La synthèse translésionnelle ou TLS est le processus au cours duquel les ADN polymérasés spécialisés synthétisent de l'ADN en face d'une lésion (Friedberg et al., 2005).

Selon le modèle, lorsque la fourche de réplication est bloquée au niveau d'une lésion, **PCNA est mono-ubiquitiné en K164 par Rad6/Rad18** (Hoegge et al., 2002). Cette modification permet le **recrutement d'ADN polymérasés translésionnelles** qui remplacent transitoirement les ADN polymérasés réplicatives (Kannouche et al., 2004; Friedberg et al., 2005; Prakash et al., 2005).

L'insertion d'un nucléotide en face de la lésion et l'extension après la lésion peut nécessiter l'action coordonnée de 2 ou plus polymérasés TLS. Chez les eucaryotes, l'extension après une lésion pourrait être effectuée par Pol ζ principalement et peut être par Pol κ (Livneh et al., ; Prakash et al., 2005; Prakash and Prakash, 2002). Il a été suggéré que des associations éphémères de plusieurs polymérasés avec la lésion se forment jusqu'à ce que la bonne soit capable de franchir la lésion (McCulloch and Kunkel, 2008). Suivant ce modèle, le tri serait passif et basé sur l'efficacité des différentes polymérasés (McCulloch et al., 2004b; McCulloch et al., 2004c).

A. Les ADN polymérasés translésionnelles

Les ADN polymérasés translésionnelles sont présentes dans les organismes des trois domaines de la vie. Elles sont pour la plupart membres de la **famille Y** (Ohmori et al., 2001) qui comprend **Pol η , Pol ι Rev1, Pol κ** , et Rev1 chez les eucaryotes (Figure 23). Enfin, **Pol ζ** est un membre de la **famille B** capable d'effectuer la TLS.

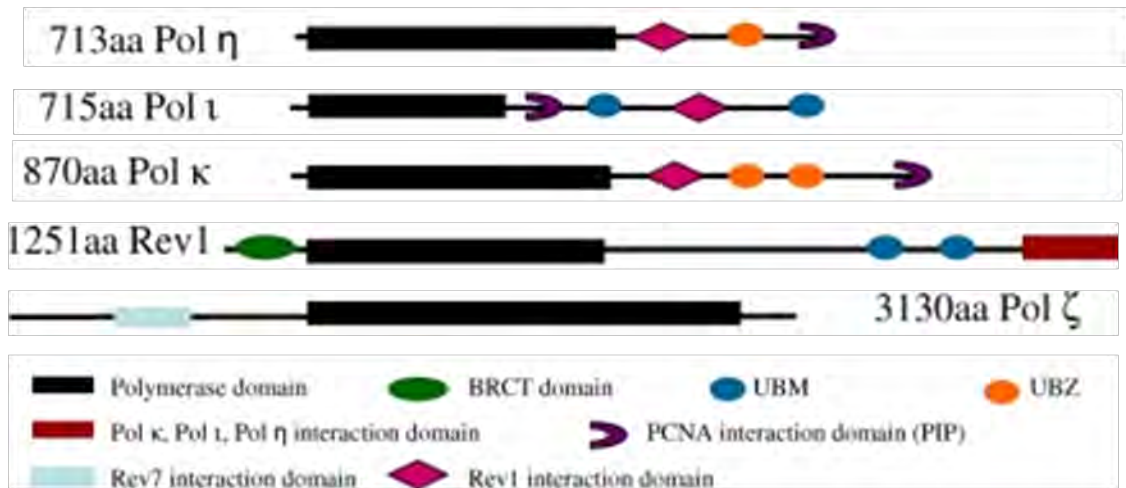


Figure 23: Représentants eucaryotes de la famille Y des ADN polymérases et l'ADN polymérase ζ. Adapté de Waters et al., 2009.

Des ADN polymérases possédant une activité de TLS ont aussi été décrites dans les familles A et X des ADN polymérases, mais cette activité est souvent faible ou n'est pas l'activité principale de ces polymérases (Moon et al., 2007). Ces polymérases sont **Pol θ** de la famille A, **Polβ**, **Polλ** et **Polμ** de la famille X (Arana et al., 2008).

1. Généralités

En 1971, Jeffrey Lemontt a isolé des gènes impliqués dans le processus de mutagenèse induite par les UV (Lemontt, 1971). Il s'agit des gènes *REV1* (codant pour la polymérase Rev1), *REV3* (codant pour la sous-unité catalytique de Polδ) et *REV7* (codant pour la seconde sous-unité de Polδ). Une recherche analogue chez *E. coli* a abouti à l'identification de *DinB* et *umuC* (codant pour la sous-unité catalytique d'UmuD₂C, DNA polymérase V). D'autres gènes codant pour des polymérases translésionnelles ont été pour la première fois identifiés en raison de leur homologie avec *REV1*, *umuC* ou *DinB* comme *RAD30* et *Polι* (*hRAD30B*) (Revue: Waters et al., 2009).

En 1996, la première description biochimique d'une polymérase spécialisée dans la TLS apparaît : Polδ capable de franchir un dimère de thymine de type cyclobutane (Nelson et al., 1996b), rapidement suivie par la démonstration que Rev1 est capable d'insérer un C en face d'un site abasique (Nelson et al., 1996a). Avec la caractérisation de l'activité de polymérase translésionnelle de Polε (Masutani et al., 1999a ; Masutani et al., 1999b), il a été reconnu que tous ces gènes codent en fait pour des ADN polymérases possédant la capacité

unique de répliquer des molécules d'ADN endommagées (Goodman, 2002 ; Prakash et al., 2005).

Les structures cristallographiques ont permis d'expliquer les propriétés catalytiques uniques des membres de la famille Y (Trincao et al., 2001;Silvian et al., 2001; Ling et al., 2001; Zhou et al., 2001; Ling et al., 2003; Uljon et al., 2004; Nair et al., 2004; Nair et al., 2005b). Malgré l'absence d'homologie de séquence primaire avec les ADN polymérases classiques, les membres de la famille Y présentent la même structure en « **main droite** » (Prakash et al., 2005). Comme pour les ADN polymérases répliquatives, les résidus catalytiques aspartate et glutamate, qui coordonnent les ions bivalents magnésium stabilisant le groupe triphosphate du dNTP, sont présents dans la région de la **paume** (Yang, 2003; Prakash et al., 2005) (Figure 24). Les domaines **doigt** et **pouce**, empoignent l'ADN et ont respectivement des contacts avec le brin matrice et l'amorce (Yang, 2003; Prakash et al., 2005) (Figure 24). Les membres de la famille Y ne possèdent **pas de domaine 3'-5' exonucléase** (Goodman, 2002). Un domaine « **petit doigt** » ou **PAD** (polymerase-associated domain) (Ling et al., 2001; Silvian et al, 2001) ou « poignet » (wrist) (Trincao et al., 2001) est présent uniquement dans cette famille et s'étend depuis le domaine des doigts pour augmenter les contacts avec l'ADN (Yang, 2003) (Figure 24). Cette région, qui est la moins conservée au sein des polymérases, est en contact avec la partie lésée de l'ADN (McCulloch et al., 2004a; McCulloch et al., 2004c) et serait **impliquée dans la spécificité des polymérases pour une lésion donnée** (Boudsocq et al., 2004). L'ADN polymérase Polk contient une région additionnelle appelée "**N-clasp**" qui contribue à la liaison avec l'ADN (Lone et al., 2007).

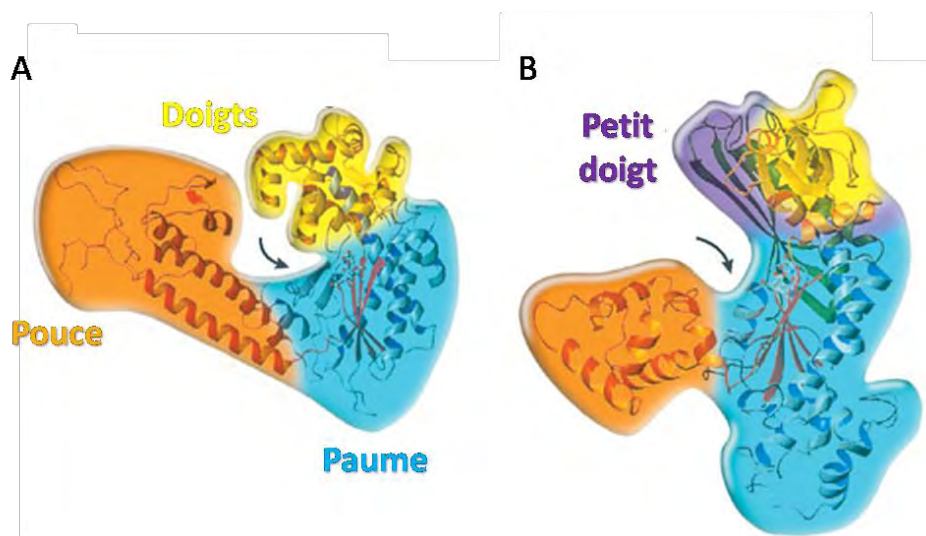


Figure 24: Structure des ADN polymérases répliquatives (A) et des ADN polymérases translésionnelles (B). Le site catalytique est indiqué par une flèche. Adapté de Friedberg, 2005.

Les propriétés des ADN polymérase translésionnelles leur permettent d'utiliser une grande variété d'ADN lésés comme matrices mais elles leur confèrent aussi **une faible fidélité de réplication**. En comparaison des ADN polymérase répliquatives, qui possèdent des taux d'erreurs d'incorporation de 10^{-6} à 10^{-8} , les ADN polymérase translésionnelles incorporent 1 mauvais nucléotide toutes les 100 à 10 000 bases (Goodman, 2002;; Prakash et al., 2005). Les polymérase translésionnelles ont donc potentiellement une activité mutagène au sein de la cellule (Friedberg et al., 2002) et **doivent être régulées *in vivo***. Quand elles sont **surexprimées** ou **régulées de manière inappropriée**, certaines d'entre elles confèrent **un phénotype hypermutateur à la cellule**, comme **Polk et DinB** (Ogi et al., 1999; Lenne-Samuel et al., 2002; Bergoglio et al., 2002; Bavoux et al., 2005).

Le risque de mutagenèse peut être contrebalancé par le fait que **ces protéines apportent une résistance à différents agents endommageant l'ADN**. En général, les mutations induites par ces protéines sont des substitutions de bases moins dommageables pour l'intégrité du génome que des translocations et des réarrangements chromosomiques. Les polymérase translésionnelles participent à la réplication d'ADN difficile à répliquer: ainsi **Rev1 contribue à la stabilité des répétitions de trinuécléotides** (Collins et al., 2007) et **Polη jouerait un rôle dans la recombinaison homologue** grâce à sa capacité d'étendre des D-loop (Kawamoto et al., 2005; McIlwraith et al., 2005; McIlwraith and West, 2008). Chez les eucaryotes supérieurs, les polymérase translésionnelles et plus particulièrement Polη et Rev1 sont impliqués dans **l'hypermutation somatique** (Zeng et al., 2001; Faili et al., 2004; Zeng et al., 2004; Delbos et al., 2005; Martomo et al., 2005; Jansen et al., 2006; Martomo et al., 2006; Delbos et al., 2007; Masuda et al., 2009).

2. Polη

L'ADN polymérase η codé par le gène *Polh* sur le chromosome 6p21.1 est une protéine de 713 acides aminés (Yuasa et al., 2000). Des mutations dans le gène de *Polh* entraînent la forme variante de la maladie génétique *Xeroderma pigmentosum* (XP-V), maladie caractérisée par une extrême sensibilité au soleil et une prédisposition au cancer de la peau (Cleaver, 1972).

a. *Xeroderma pigmentosum* variant

Les patients atteints par la forme variant de la maladie *Xeroderma pigmentosum* (XP-V) ont un mécanisme de réparation des nucléotides fonctionnel mais présentent un **défaut de TLS** au travers des lésions induites par les UV (Lehmann et al., 1975; Lehmann et al., 1977). En effet, la réplication de dommages induits par les UV est inefficace dans des extraits de cellules XP-V (Cordeiro-Stone et al., 1997; Ensch-Simon et al., 1998; Svoboda et al., 1998), dans lesquelles l'ADN polymérase translésionnelle η est déficiente (Masutani et al 1999a;; Masutani et al 1999b; Johnson et al 1999). Pol ϵ est impliquée dans le franchissement fidèle de deux adénines en face des dimères de thymine de type CPD, lésion majoritairement formée après un traitement aux UV (Masutani et al. 2000; Johnson et al., 2000b; Haracska et al., 2000; Stary et al., 2003). Elle n'est, en revanche, pas capable de répliquer les photo-produits 6-4 (Zhang et al., 2000a). Les cellules XP-V sont également plus sensibles au cisplatine que les cellules XP-V complémentées par l'expression d'une protéine Pol ϵ fonctionnelle ou que les cellules normales (de type MRC5) (Albertella et al., 2005). En effet, les pontages intra-brin induits par le cis-platine ne peuvent être répliqués par les ADN polymérases répliquatives et constituent donc des lésions bloquant la réplication de l'ADN (Hoffmann et al., 1995). De même, les cellules XP-V sont aussi plus sensibles à des agents tels que le carboplatine ou l'oxaloplatine qui forment également des pontages intra-brin (Albertella et al., 2005).

Les différents **types de mutations de Pol η** observés chez les patients XPV peuvent être classés en trois catégories : une troncation sévère induisant la **perte du domaine catalytique**, une troncation moins sévère conduisant à la **perte du domaine C-terminal** et enfin des **mutations faux sens** au niveau des résidus conservés du domaine catalytique (Broughton et al., 2002; Masutani et al., 1999b).

L'inhibition de la réplication observée dans ces cellules après une irradiation aux UVC est caractérisée par une réduction du nombre de fourches actives. Des régions d'ADN simple-brin s'accumulent et **le checkpoint de la réplication est activé** à des doses d'UV moins importantes que dans des cellules normales (Bomgarden et al., 2006; Holway et al., 2006; Yan and Michael, 2009; Hicks et al 2010; Despras et al., 2010). Ce phénotype explique la raison pour laquelle ces cellules deviennent **particulièrement sensibles aux UV en présence de caféine** (Arlett et al., 1975). En effet, après traitement des cellules avec ce composé, la phosphorylation de Chk1 est inhibée et le nombre de fourches bloquées est augmenté. L'inhibition du checkpoint de la réplication dans les cellules XP-V empêcherait l'usage de

mécanismes alternatifs qui permettraient d'éviter l'effondrement des fourches et la mort cellulaire (Despras et al., 2010) (Figure 25). Il a été proposé qu'un des mécanismes de tolérance des dommages qui a lieu en l'absence de Pol η dans ces cellules serait de type recombinaison homologe (Limoli et al. 2005). L'induction du checkpoint de la réplication favoriserait ce mécanisme en phosphorylant différents acteurs comme Rad51 ou les hélicases Werner et Bloom (Pichierri et al., 2003; Davies et al., 2004; Sorensen et al., 2005).

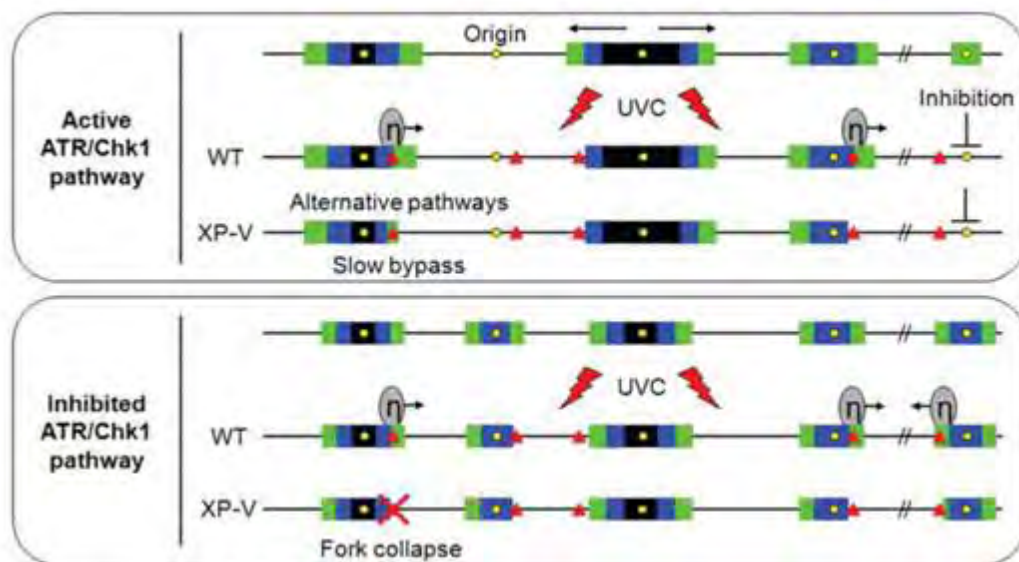


Figure 25: La réplication de l'ADN endommagé par les UVC dans des cellules humaines normales et dans les cellules XPV. Dans les cellules normales irradiées aux UV, Pol η agit au niveau des fourches bloquées pour franchir les lésions sans besoin de l'activation du checkpoint de la réplication (en haut). Par contre, dans les cellules XPV, le checkpoint est suractivé en raison de l'augmentation du nombre de fourches bloquées au niveau d'une lésion de l'ADN et l'activité d'ATR permet la stabilisation des fourches et l'usage de voies de tolérance des dommages alternatives (en haut). Lorsque le checkpoint est inhibé par l'action de la caféine, les fourches ne sont pas stabilisées. En absence de Pol η , les lésions ne sont pas franchies, menant à l'effondrement des fourches et à la mort de la cellule (en bas) . Issu de Despras et al., 2010.

b. Les différents domaines de Pol η

Chez les mammifères, Pol η possède:

- un **domaine catalytique** (résidus 1 à 350) en N terminal (Kannouche et al., 2001)
- un **domaine UBZ** (résidus 631 à 659) (ubiquitine-binding zinc finger), en C-terminal, responsable de l'interaction avec l'ubiquitine et nécessaire pour la relocalisation de Pol ϵ dans les foyers après UV (Bienko et al., 2005).
- **deux domaines de liaison avec Rev1** (résidus 509-557 et 369-491) (Tissier et al., 2004 ; Ohashi et al., 2004). Récemment, il a été montré que quatre phénylalanines sont nécessaires pour la liaison avec Rev1 (F483, F484, F531, F532). Les mutations spontanées observées dans les cellules XP-V ne sont que partiellement supprimées après complémentation avec un

mutant de Pol ϵ incapable d'interagir avec Rev1, suggérant **un rôle de cette liaison pour la TLS des lésions endogènes de l'ADN** (Akagi et al., 2009). Cette fonction n'est apparemment pas conservée chez la levure, où l'on n'observe pas d'interaction entre Rev1 et Pol η *in vivo* (Kosarek et al., 2008).

- **un domaine PIP2** en C terminal (résidus 702 à 708) (Haracska et al. 2001a) impliqué dans la liaison avec PCNA.

- **un autre motif PIP (PIP1)** a été récemment identifié dans l'un des deux motifs Rev1. Ce motif est requis pour la survie des cellules humaines irradiées aux UV et pour la stimulation de l'activité de Pol ϵ par PCNA dans les cellules humaines (Acharya et al., 2008).

- **un motif NLS** (résidus 682 à 698), qui interagit lui aussi avec PCNA, forme avec PIP2 la **région PIR** (PCNA-interacting region) située en C terminal (Bienko et al., 2010). Cette région régule la localisation de Pol η dans le noyau et la formation des foyers en l'absence de dommages (Figure 26).

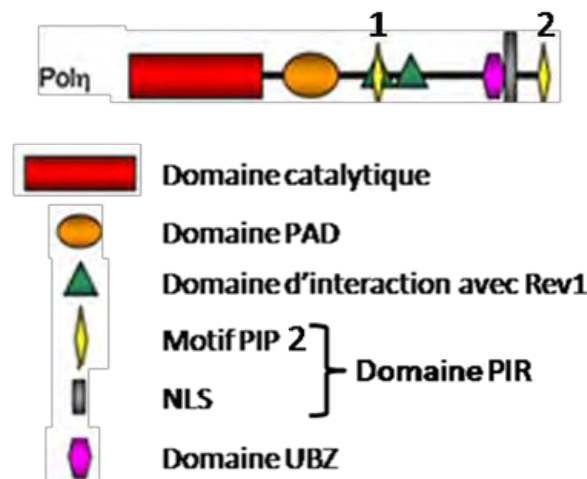


Figure 26: Les différents domaines de Pol η . Adapté de Guo et al., 2009.

c. Accumulation aux foyers de réplication

Pol η est **localisée de manière uniforme dans le noyau dans 90%** des cellules transfectées avec un vecteur exprimant Pol η fusionnée avec la GFP. Dans les **10%** de cellules restantes, Pol η forme de **nombreux foyers** visibles par immunofluorescence et **colocalise avec PCNA**, impliquant que cette protéine se trouve dans les **foyers de réplication** (Kannouche et al., 2001).

Le pourcentage de cellules où se forment des foyers GFP-Pol η augmente après irradiation des cellules aux UV jusqu'à plus de 60% (Kannouche et al., 2001; Watanabe et al.,

2004; Kannouche et al., 2004 ; Bienko et al., 2005 ; Plosky et al., 2006). Ce recrutement nécessite les 120 acides aminés du **C-terminal de Pol η** (qui inclut le domaine UBZ et le domaine d'interaction avec PCNA) (Kannouche et al., 2001; Bienko et al., 2005; Plosky et al., 2006) et son **interaction avec Rad18** (résidus 556 à 713) (Watanabe et al., 2004).

Pol η manifeste une plus grande affinité pour PCNA lorsque celui-ci est mono-ubiquitiné (Watanabe et al., 2004 ; Kannouche et al., 2004; Bienko et al., 2005; Plosky et al., 2006). La mutation C638A dans le domaine UBZ de Pol η diminue la survie des cellules aux UV plus fortement que des mutations du domaine PIP (Bienko et al., 2005). Il a alors été proposé que **la liaison de Pol η à PCNA mono-ubiquitiné via les domaines UBZ et PIP est requise pour son accès aux fourches de réplication bloquées.**

Cependant l'étude de **différentes mutations du domaine UBZ de Pol η** chez *S. cerevisiae* (Acharya et al., 2007) et dans les cellules humaines (Acharya et al., 2008) a montré que **la survie des cellules aux UV et la liaison à l'ubiquitine ne sont pas nécessairement liées.** En effet, les mutants C635A et H650A du motif C₂H₂ ne sont pas sensibles aux UV alors que ces acides aminés sont nécessaires pour la liaison à l'ubiquitine (Acharya et al., 2008) (Figure 27). De plus, Sabbioneda et al ont montré que l'ubiquitination de PCNA n'est pas nécessaire pour la relocalisation de Pol η après UV mais augmente son temps de résidence aux foyers de réplication bloqués (Sabbioneda et al., 2008). **Le domaine UBZ de Pol η serait nécessaire pour sa localisation aux sites de dommages en permettant une liaison avec des protéines, autres que PCNA, mono-ubiquitinées** (Sabbioneda et al., 2008) **ou non** (Acharya et al., 2008).

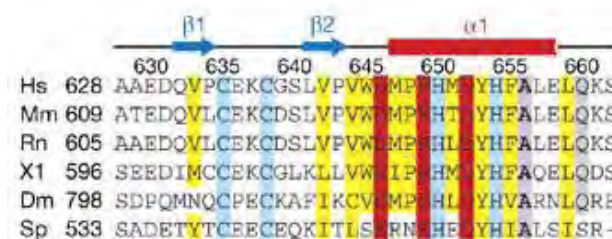


Figure 27: Alignement des séquences des domaines UBZ de Pol η de différentes espèces. Le domaine UBZ consiste en deux feuillets β et une hélice α . Les cystéines et histidines qui sont les ligands du zinc (motif C₂H₂) sont en bleu, les résidus hydrophobes conservés en jaune, les résidus acides en rouge, l'alanine conservée en mauve et une glutamine hautement conservée en gris. Les résidus D652, F655, L657 et K661 sont impliqués dans la liaison à l'ubiquitine *Homo sapiens* (Hs): résidus 628–662; *Mus musculus* (Mm): résidus 609–643; *Rattus norvegicus* (Rn): résidus 605–639; *Xenopus laevis* (Xl): résidus 596–630; *Drosophila melanogaster* (Dm): résidus 798–832; *Schizosaccharomyces pombe* (Sp): résidus 533–566. pol, polymérase; UBZ, ubiquitin-binding zinc finger. Adapté de Bomar et al. 2007.

Récemment, une étude a montré que Pol η forme aussi des foyers aux sites de dommages UV dans des cellules **en dehors de la phase S** (Soria et al., 2009, Akagi et al., 2009), **indépendamment de PCNA et du mécanisme de réparation par excision de**

nucléotides NER. De manière surprenante, le **motif PIP2** de Pol η est tout de même requis pour la formation des foyers. Les foyers de Pol η en G1 pourraient représenter un **découplage temporel entre le recrutement de la protéine et son activité de TLS.** Pol η pourrait être recrutée aux sites de dommages en avance pour être prête à l'action si la réparation échoue ou n'a pas lieu avant l'arrivée de la fourche de réplication. **Le signal responsable de ce recrutement n'est pas connu.** Ce pourrait par exemple être la polymérase translésionnelle Rev1 qui s'accumule elle-aussi aux sites de dommages en dehors de la phase S (Murakumo et al., 2006) et qui interagit avec Pol η (Tissier et al., 2004 ; Ohashi et al., 2004). Cette étude pose d'intéressantes questions concernant la signification des foyers nucléaires. Ces foyers correspondent à une augmentation locale de la concentration de la protéine, ce qui permet une augmentation des cinétiques de réactions dans lesquelles la protéine est impliquée. Cependant, l'absence de foyers n'implique pas forcément la perte d'une fonction. En effet un mutant du domaine PIP2 de Pol η ne forme pas de foyers mais peut néanmoins compléter la sensibilité des cellules Pol η ^{-/-} (Gueranger et al., 2008).

d. Régulation de Pol η

Différents mécanismes semblent exister pour réguler l'accès de Pol η aux sites de réplication bloquée :

- Pol η est **phosphorylée en réponse aux UV par la protéine kinase C.** La mutation des deux sites putatifs de phosphorylation (PKC) empêche la formation des foyers nucléaires de Pol η après UV ou d'autres agents endommageant (Chen et al., 2008).

- Dans les cellules humaines, Pol η est **mono-ubiquitinée** et des mutations dans le domaine UBZ de Pol η inactive cette modification (Bienko et al., 2005). Comme Pol η mono-ubiquitinée ne peut se lier à PCNA ubiquitiné, il a été proposé que **la mono-ubiquitination de Pol η permet son détachement de PCNA après la TLS** (Bienko et al., 2005). Chez la levure, des études génétiques ont montré que la mono-ubiquitination de Pol η a lieu indépendamment des dommages sur l'ADN et ne requiert pas Rad6/Rad18 (Parker et al., 2007). Très récemment, Bienko et ses collaborateurs ont montré que le motif NLS est la cible d'une mono-ubiquitination. Une **interaction intramoléculaire entre le domaine UBZ et l'ubiquitine masquerait le domaine PIR et rendrait impossible l'interaction avec PCNA.** Une chimère Pol η -ubiquitine est en effet incapable de restaurer la sensibilité des cellules XPR30RO. Quand les cellules sont endommagées par les UV, le cisplatine ou le MMS, Pol η

est dé-ubiquitinée par une enzyme inconnue, libérant le domaine PIR et permettant une liaison entre Pol η et PCNA (Figure 28). Le checkpoint de la réplication (ATR, p53) et le mécanisme de réparation par excision de nucléotides (XPA) ne sont pas impliqués dans la dé-ubiquitination de Pol η en réponse à des dommages (Bienko et al., 2010).

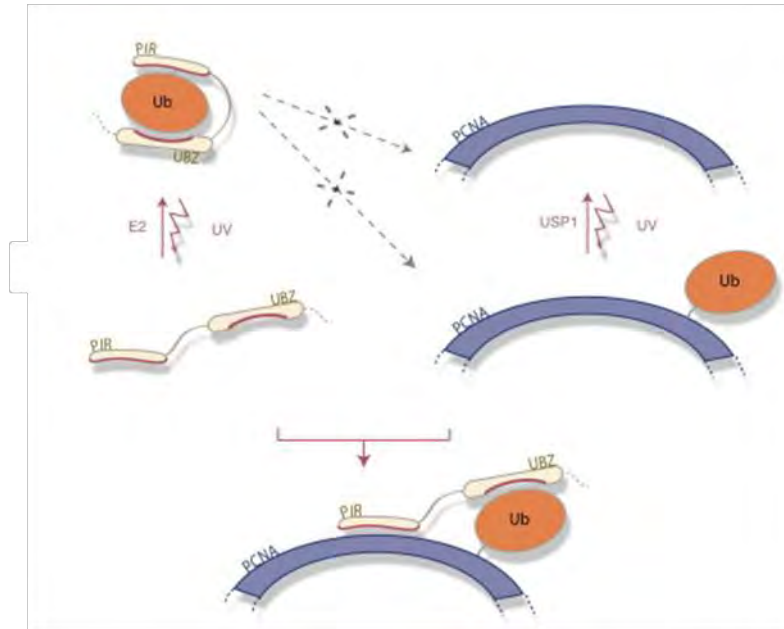


Figure 28: Effet de l'ubiquitination de Pol η sur son interaction avec PCNA. La mono-ubiquitination de PCNA au niveau de son domaine PIR (PCNA-interacting domain) résulte en une interaction intramoléculaire entre l'ubiquitine et le domaine UBZ de Pol η , masquant le domaine PIR et empêchant ainsi toute interaction avec PCNA. Lorsque les cellules sont irradiées, la mono-ubiquitination de PCNA et la dé-ubiquitination de Pol η facilite l'interaction entre les deux protéines. Seul le C-terminal de Pol η est présentée. Adapté de Bienko et al., 2010.

- La protéine chaperonne **Hsp90** est impliquée dans la formation des foyers de Pol η en réponse aux UV en contrôlant sa stabilité et sa liaison avec PCNA mono-ubiquitiné. Hsp90 faciliterait le repliement de Pol ϵ en une forme active dans laquelle les régions UBZ et d'interaction avec PCNA seraient alors fonctionnelles. En effet, Hsp90 s'associe avec Pol η et régule sa concentration et sa localisation (Sekimoto et al., 2010) (Figure 29).

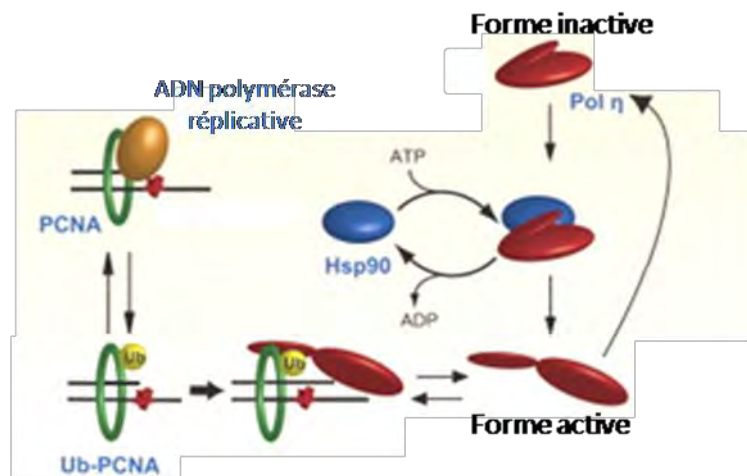


Figure 29: Rôle de HSP90 dans la régulation de la conformation de Pol η . Adapté de Sekimoto et al., 2010.

- Le recrutement de Pol η implique aussi **l'interaction avec Rev1 et Rad18** dans les cellules de mammifères (Guo et al., 2003; Tissier et al., 2004 ; Ohashi et al., 2004 ; Watanabe et al., 2004). Pol η existe en complexe avec Rad6/Rad18 et Rev1 après une irradiation UV (Yuasa et al., 2006). Rev1 pourrait agir comme plate-forme pour le recrutement de Pol η (Guo et al., 2003; Tissier et al., 2004; Edmunds et al., 2008).
- La localisation de Pol η est aussi régulée par la **protéine p21** en tant que régulateur négatif de l'interaction entre Pol η et PCNA (Soria et al., 2008). La dégradation de p21 après UV représente donc un événement critique pour le succès de la TLS (Prives and Gottifredi, 2008) et permet la libération des sites de liaison de PCNA et le recrutement de Pol η (Figure 30).

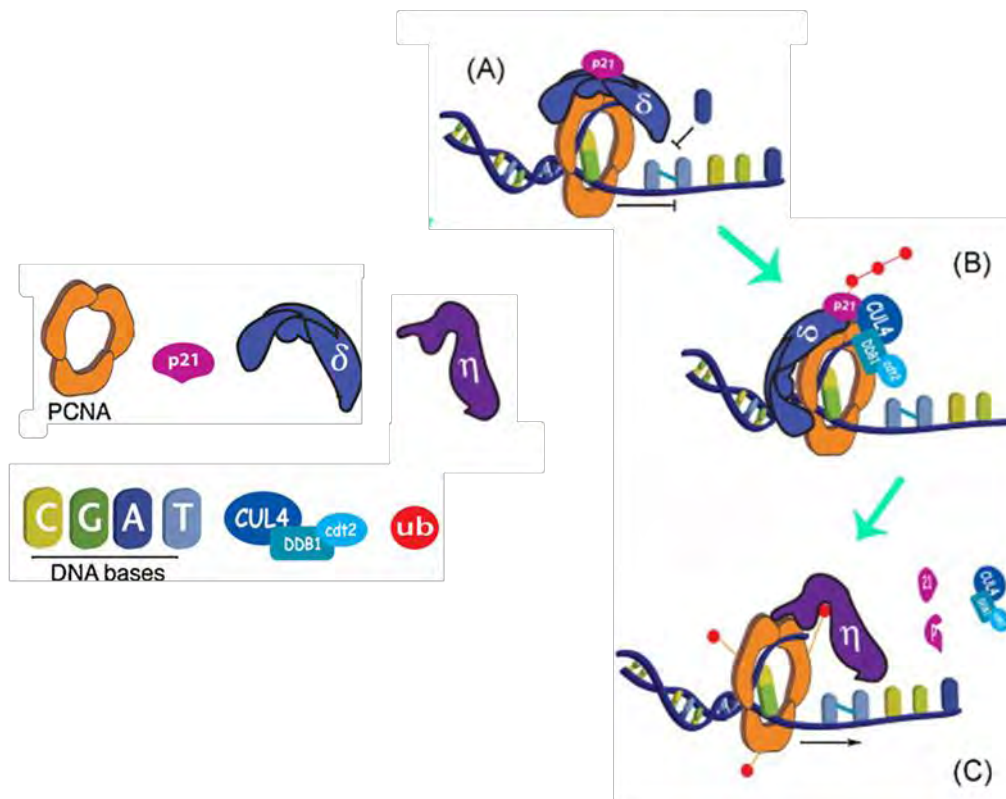


Figure 30: Régulation de la synthèse translésionnelle par la dégradation de p21. A. La fourche de réplication est bloquée au niveau d'une lésion de type dimère de thymine. Jusqu'alors, p21 et la polymérase répliquative interagissent avec PCNA. B. CRL4^{Cdt2} est recrutée et ubiquitine p21. C. p21 est dégradée ce qui permet la mono-ubiquitination de PCNA et le recrutement de Pol η . Adapté de Soria and Gottifredi, 2010.

- Chez *C. elegans*, il a été proposé que Pol η associée au niveau des sites de dommages de l'ADN est **SUMOylée par** la SUMO ligase E3 **GEI-17** au niveau de ses lysines 85 et 260, ce qui la **protège temporairement de la poly-ubiquitination** par CRL4-Cdt2 et donc de la dégradation, **le temps de remplir sa fonction** (Kim and Michael, 2008). Pol η dégradée une fois la TLS accomplie, l'ADN polymérase répliquative pourrait alors reprendre sa place (Figure 31).

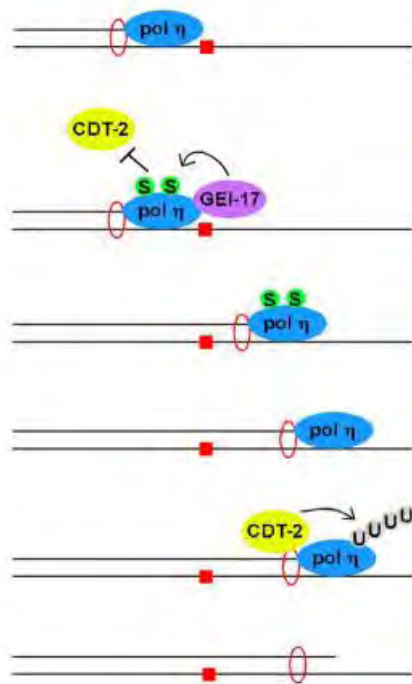


Figure 31: Modèle de régulation de Pol η par GEI-17 et CRL4Cdt2 lors de la réponse aux dommages de l'ADN. Pol η est SUMOylée par GEI-17, ce qui inhibe sa dégradation par CRL4Cdt2 (CDT2 en jaune) jusqu'à ce que la TLS soit réalisée. Adapté de Kim and Michael, 2008.

Toutes ces données nous montre que Pol η est régulée de manière très fine et d'autres études sont nécessaires pour mieux comprendre comment cette régulation est coordonnée.

e. Les différents rôles de Pol η

- Rôle dans la TLS

Chez la levure et l'homme, Pol η peut **répliquer** à travers les **CPD** *in vitro* (Johnson et al., 2000b; Washington et al., 2000). L'incorporation de deux A à l'opposé des deux T du dimère intervient avec la même efficacité et fidélité qu'en présence de 2 T non endommagés (Johnson et al., 2000b; Masutani et al., 2000; Yoon et al., 2009).

En revanche, cette ADN polymérase n'est pas capable de répliquer une autre lésion induite par les UV, les photo-produits 6-4. Elle n'incorporerait qu'une guanine en face du premier T puis se dissocierait de l'ADN et Pol δ serait impliquée dans l'étape d'élongation (Zhang et al., 2000a).

Pol ϵ est aussi capable de répliquer d'autres types de lésions tels que les **O⁶-méthylguanines** en insérant un C ou un T (transition G en A) (Vaisman et al., 2000; Basset et al., 2004; Shachar et al., 2009) ou les **8-oxodésoxyguanosines** (8-oxoG) en insérant un C ou

un A (Haracska et al., 2000; Zhang et al., 2000a; Maga et al., 2007; Lee and Pfeifer, 2008; Kamiya et al., 2010).

Enfin, Pol η est infidèle lors du le franchissement du **BPDE-dG** (benzo(a)pyrene 7,8-diol 9,10-epoxide deoxyguanosine) *in vitro*, en préférant insérer G ou A par rapport à T ou à la base correcte C (Chiapperino et al., 2002). Par conséquent, Pol ϵ est spécialisée dans la réplication fidèle des dimères de thymines, mais son site actif plus ouvert lui permet de répliquer d'autres lésions de manière infidèle.

- Rôle dans le franchissement des pontages de l'ADN

Pol η serait aussi impliquée dans le franchissement **des pontages de l'ADN**. En effet, les cellules XP-V sont aussi sensibles au cisplatine, carboplatine et oxaloplatine que les cellules déficientes pour le mécanisme de réparation par excision de nucléotides (Albertella et al., 2005). De plus, Pol η est associée à PCNA au niveau des foyers de réplication après traitement des cellules au cisplatine (Albertella et al., 2005). Pol η serait donc au moins aussi importante que les facteurs du NER pour la survie des cellules après un traitement au cisplatine. Plusieurs études ont ainsi montré que Pol η , REV1 et Pol δ sont impliqués dans le franchissement des **pontages intra-brins dus au cisplatine** (Wu et al., 2004; Bassett et al., 2004; Okuda et al., 2005; Chen et al., 2006; Hicks et al., 2010;) (Figure 32).

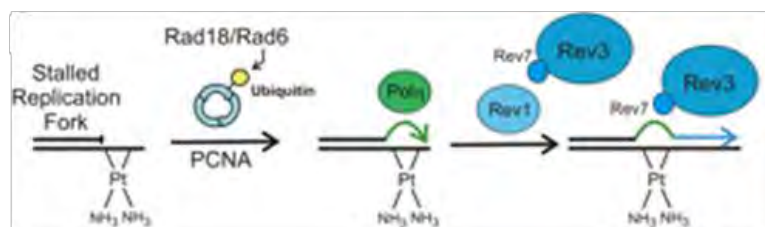


Figure 32: Modèle du franchissement des pontages intra-brin induits par le cisplatine. Le complexe Rad6/Rad18 mono-ubiquitine PCNA en réponse à l'arrêt de la fourche de réplication au niveau de la lésion. Pol η serait alors recrutée et insérerait le premier nucléotide, tandis que Pol ζ (Rev3 et Rev7), avec l'aide de Rev1, serait impliquée dans l'élongation. Adapté de Hicks et al 2010.

Par contre, si Rev1 et Pol δ semblent impliqués avec NER dans la réparation des pontages inter-brins (Sarkar et al., 2006; Shen et al., 2006; Hicks et al., 2010), l'implication de Pol η n'est pas claire. En effet, les cellules déficientes en Pol ϵ ne sont pas sensibles à des agents tels que la Mitomycine C (MMC) qui induisent des pontages inter-brins (Albertella et al., 2005; Hicks et al., 2010). Cependant, deux études ont montré que Pol η serait néanmoins requise pour **la TLS des pontages inter-brins** induits par la MMC (Zheng et al., 2003) et par le sporalène. Pol η pourrait agir durant les deux mécanismes impliqués dans la réparation de

ces pontages: la recombinaison homologue et NER (Zheng et al., 2003; Rothfuss and Grompe, 2004; McIlwraith et al., 2005; Mogi et al., 2008; McIlwraith and West, 2008).

- Rôle dans le MMR

Pol η interagit avec **PMS2/MLH1** (hétérodimère MutL α), **MSH2**, **MSH3** et **MSH6** (Wilson et al., 2005; Kanao et al., 2009). L'interaction entre Pol η et les protéines du MMR augmente dans la chromatine durant la phase S. Le rôle du MMR étant de corriger les erreurs durant la réplication de l'ADN, la **collaboration entre Pol η et les protéines du MMR** pourrait garantir une réplication de l'ADN sans erreur (Kanao et al., 2009).

- Rôle dans l'hypermutation somatique

Etant mutagènes, et possédant une faible processivité sur l'ADN non-endommagé, les ADN polymérase translésionnelles sont les candidates parfaites pour la génération de mutations durant **l'hypermutation somatique** (SHM). Ce mécanisme permet de diversifier les gènes des immunoglobulines (Ig) lors de la différenciation des cellules B (Longo and Lipsky, 2006). Il est initié par l'enzyme AID (Activation-Induced-cytidine Deaminase) qui transforme les cytosines en uraciles dans les cellules B activées (Muramatsu et al., 2000). Le complexe MSH2/6 et l'uracil-N-glycosylase (UNG) vont ensuite intervenir au niveau des uraciles (Rada et al., 2002; Rada et al., 2004). Les mutations introduites sont distribuées de manière équivalente entre A/T et G/C, ce qui augmente le spectre de mutations et donc la diversité des anticorps (Reynaud et al., 2003).

Plusieurs études ont impliquées Pol ϵ dans le SHM. En effet, les patients XP-V présentent une mutagenèse réduite au niveau des bases A/T dans les gènes Ig (Zeng et al., 2001; Faili et al., 2004; Zeng et al., 2004). L'inactivation de Pol ϵ chez la souris aboutit au même phénotype (Delbos et al., 2005; Martomo et al., 2005; Martomo et al., 2006). Récemment, il a été montré que Pol ϵ serait la principale polymérase impliquée dans la mutagenèse A/T (Faili et al., 2007) (Figure 33).

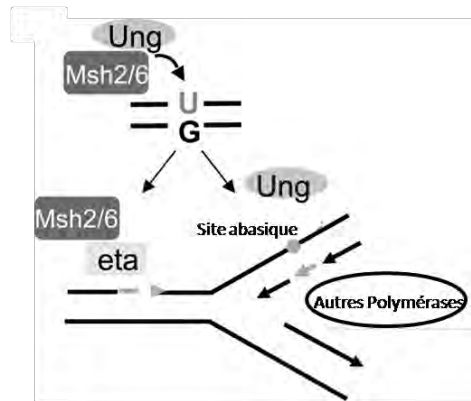


Figure 33: L'hypermutation somatique. En présence du complexe Msh2/6, la protéine UNG crée majoritairement des sites abasiques au niveau des uraciles. Ces lésions de l'ADN vont être franchies durant la phase S par Rev1, Rev3. MSH2–MSH6 recrutent Polη pour franchir la lésion en phase G1. Adapté de Delbos et al., 2007.

- Rôle dans la recombinaison homologue

Plus récemment Pole a été impliquée au niveau du mécanisme de **recombinaison homologue** pour réparer les cassures de l'ADN. En effet, une étude a mis en évidence une activité capable d'étendre une **D-loop** (un intermédiaire de la HR) à partir d'extraits totaux de cellules HeLa. Cette activité est présente dans toutes les fractions contenant Pol ε mais est absente dans les extraits de cellules XP-V naturellement déficientes en Pole (McIlwraith et al., 2005). De plus, il a été montré que Pol ε purifiée pouvait étendre une D-loop, *in vitro*, contrairement à d'autres ADN polymérase telles que Pol δ et Pol ι. Les foyers de Pol ε co-localisent, de manière partielle, avec des foyers RAD51 dans les cellules humaines seulement après irradiations UV (Kannouche et al., 2001). McIlwraith et al démontrent que Pol ε et RAD51 interagissent après irradiations UV et que la protéine RAD51 stimule l'activité d'élongation de Pol ε au niveau d'une D-loop *in vitro* (McIlwraith et al., 2005). Dans une étude plus récente, le même groupe a démontré que RAD52, RPA et Pol ε étaient nécessaires pour faciliter la capture de la deuxième extrémité de la cassure double-brin de l'ADN lors du mécanisme de HR *in vitro* (McIlwraith and West, 2008) (Figure 34).

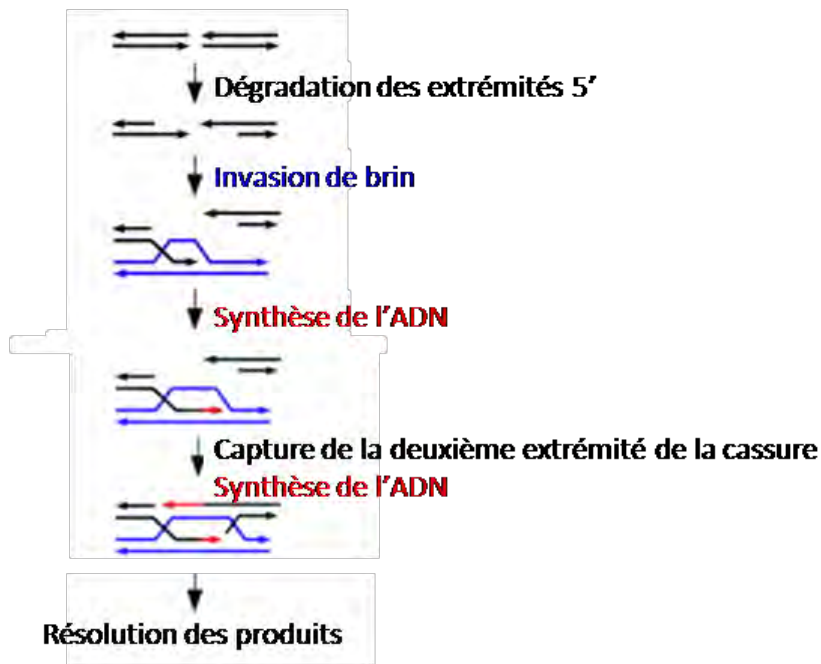


Figure 34: Modèle de la réparation des cassures double-brin de l'ADN par la recombinaison homologue. Les extrémités 5' de la cassure sont d'abord dégradés. L'invasion d'un des brins sectionné dans le duplex d'ADN homologue (en bleu) génère une structure en D-loop qui peut être étendue par Pol η (synthèse en rouge). La migration de la D-loop permet la capture de la seconde extrémité, ce qui va permettre la synthèse de l'ADN. RAD52, RPA et Pol η seraient requis pour réaliser cette capture et pour la synthèse de l'ADN. Adapté de McIlwraith and West, 2008.

- Rôle dans la stabilité des sites fragiles

Une étude montre l'implication de Pol η dans la **stabilité des sites fragiles pendant la réplication non perturbée**. En effet, l'absence de Pole affecte la progression du cycle cellulaire et le taux de prolifération des cellules. Celles-ci présentent une augmentation des cassures spontanées de chromosomes et de l'expression des sites fragiles et une modification des dynamiques des usines de réplication en phase S (Rey et al., 2009).

3. Pol ι

L'ADN polymérase ι , homologue de Pol ϵ , est une protéine de 80 kDa codée par le gène POLI localisé en position 18q21.1 (Johnson et al., 1999).

a. Domaines et interactions de Pol ι

Pol ι contient:

- un **domaine catalytique** en N-terminal (Yang et al., 2003),
- un **motif PIP** pour l'interaction avec PCNA (Haracska et al., 2005). Selon les études, cette interaction augmente (Vidal et al., 2004) ou pas la processivité de Pol ι (Haracska et al., 2005).

- **deux domaines de liaison à l'ubiquitine (UBM)** (Bienko et al., 2005). Des mutations dans ces UBM abolissent le recrutement de Polt aux foyers de réplication bloqués en réponse aux UV (Bienko et al., 2005; Plosky et al., 2006).
- **un domaine d'interaction avec Rev1**. Polt interagit avec le domaine C terminal de Rev1, et en réponse aux UV, Polt colocalise avec Rev1 aux foyers de réplication (Tissier et al., 2004; Ohashi et al., 2004; Guo et al., 2003).
- **un domaine de liaison avec Polη** (Kannouche et al., 2002). Dans les cellules XP-V seulement 10 à 20% de foyers Polt induits par les UV sont formés, ce qui indique que le recrutement de Polt est dépendant de Polη (Kannouche et al., 2002). Un mutant de Polt dépourvu de son motif PIP garde sa capacité à interagir avec Polη *in vivo*, ce qui indique que cette interaction ne nécessite pas PCNA (Vidal et al., 2004).
- Pol ι ne possède pas de signal de localisation nucléaire (NLS), mais elle est tout de même localisée dans le noyau (Kannouche et al., 2002). Le domaine requis pour cette **localisation nucléaire** est compris entre les acides aminés 219 et 451 (Kannouche et al., 2002) (Figure 35).

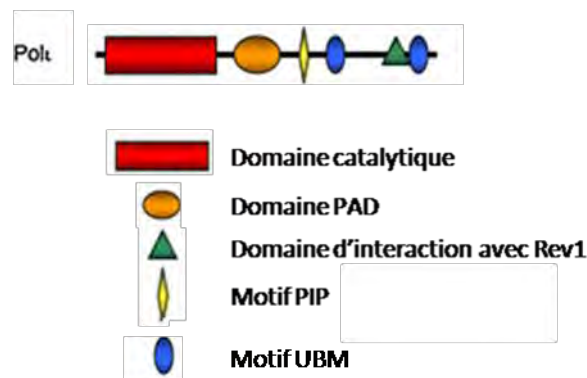


Figure 35: Les domaines de Polt. Adapté de Guo et al., 2009.

b. Les fonctions de Polt

- Propriétés enzymatiques

Pol ι incorpore des dGMP en face de la thymine 3 à 10 fois plus souvent que du dAMP (Tissier et al., 2000; Zhang et al., 2000c; Jonhson et al., 2000a). Pol ι diffère des polymérases répliquatives (comme des membres de la famille Y) par sa plus grande efficacité à incorporer des purines que des pyrimidines (Tissier et al., 2000; Zhang et al., 2000c; Jonhson et al., 2000a). Cette ADN polymérase est particulière puisque sa structure permet uniquement des appariements de bases en Hoogsteen (Nair et al., 2004; Nair et al., 2005a; Pence et al., 2009). De plus, Pol ι peut insérer des nucléotides en face des **photoproduits 6-4** et les **sites**

abasiques, mais elle n'a apparemment pas la capacité d'élonger les produits formés (Tissier et al., 2000; Johnson et al., 2000a). Cette fonction serait assurée par **Polζ** (Johnson et al., 2000a; Prakash and Prakash, 2002; Ziv et al., 2009; Livneh et al., 2010).

- Rôle dans la TLS

Les fibroblastes primaires de souris dérivés de la lignée 129/J présentent une mutation non-sens dans l'exon 2 de Polt et une sensibilité accrue aux UV comparée à celle des souris sauvages (Dumstorf et al., 2006). Toutefois les résultats sont controversés en raison d'une autre étude montrant que les fibroblastes de souris 129/J ne sont pas sensibles aux UV (Ohkumo et al., 2006). Les cellules murines ou humaines déficientes à la fois en *Polh* et *Poli* sont plus sensibles aux UV que celles déficientes en *Polh* seulement, ce qui suggère une fonction pour Polt dans la **TLS des dommages UV** (Dumstorf et al., 2006; Gueranger et al., 2008). Polt serait donc impliquée dans le franchissement des lésions UV *in vivo*, **surtout en l'absence de Polη** (Gueranger et al., 2008) (Figure 36). En accord avec cette étude, il a été montré récemment que Polδ, Polt et Polκ sont impliqués dans le franchissement des CPD dans les cellules XPV (Ziv et al., 2009).

- Rôle dans l'hypermutation somatique

En raison de sa très faible fidélité de réplication, Polt a peut-être un rôle dans **l'hypermutation somatique** (Tissier et al., 2000; McDonald et al., 2003). Cependant l'implication de Polt dans la diversification des gènes Ig est controversée. Dans la lignée cellulaire du Lymphome de Burkitt où les deux allèles ont été délétés, les cellules présentent une réduction significative dans la fréquence de mutations des régions variables des Ig (Faili et al., 2002). Mais dans les cellules 129/J déficientes pour Polt, la fréquence des mutations n'est pas altérée (McDonald et al., 2003; Martomo et al., 2006). Polt ne serait donc pas requise pour l'hypermutation somatique chez la souris (Martomo et al., 2006; Shimizu et al., 2005).

- Rôle dans le BER

Polt pourrait aussi participer à la **réparation des dommages oxydatifs par le mécanisme BER *in vivo***, indépendamment de Polη (Petta et al., 2008). En effet, les cellules humaines dont l'expression de Polt est réduite par interférence à ARN sont **sensibles à des agents oxydatifs**, comme le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂), mais pas à un traitement avec des agents alkylants comme la néocarzinostatine ou l'exposition à des rayons UV-A ou UV-C

(Petta et al., 2008). De plus, Pol κ interagit avec XRCC1 et FEN1, protéines impliquées dans le mécanisme de BER (Petta et al., 2008) (Figure 36).

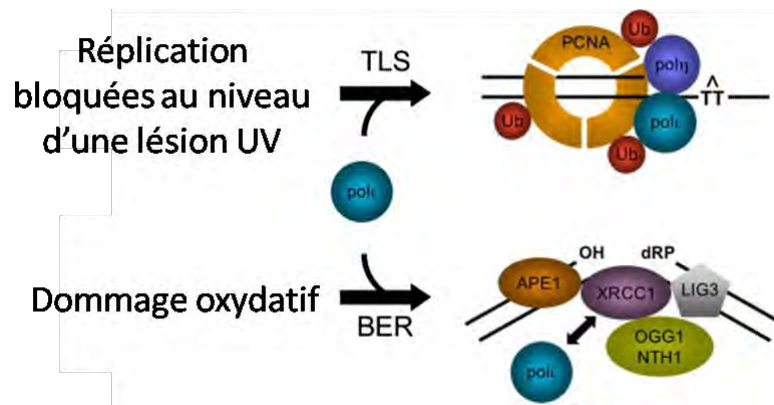


Figure 36: Les rôles possibles de Pol κ dans la TLS et la réparation des dommages oxydatifs. Les lésions de type dimère de thymines (TT) peuvent être franchies par Pol η (Masutani et al 1999; Johnson et al 2000). La présence de Pol κ aux fourches de réplication bloquées dépend de ses interaction avec Pol η , PCNA et l'ubiquitine de PCNA (Bienko et al 2005; Kannouche et al 2002; Vidal et al 2004; Plosky et al 2006). Pol κ serait impliquée dans la TLS des lésions UV en l'absence de Pol η (Gueranger et al 2008; Ziv et al 2009). Pol κ pourrait aussi participer à la réparation des dommages oxydatifs par le mécanisme BER. La figure montre quelques interactions de XRCC1 avec d'autres protéines impliquées dans le BER, comme l'ADN ligase III (LIG3), l'endonucléase APE1 et les glycosylases OGG1 et NTH1. Pol κ interagit avec XRCC1 (Petta et al 2008. Adapté de Vidal and Woodgate, 2009.

4. Pol κ

Pol κ est le membre eucaryote de la branche DinB de la famille Y (Garlach et al., 1999). Curieusement cette polymérase est absente chez *S. cerevisiae* et chez *Drosophila melanogaster* (Ohmori et al., 2001). Pol κ est une protéine de 99 kDa codée par le gène *POLK* situé en position 5q13.1 (Gerlach et al., 1999).

a. Régulation de l'expression

Un **domaine répresseur** au niveau du promoteur de *POLK* a été identifié (Lemee et al., 2007), ainsi qu' une **région activatrice**. Celui-ci contient des éléments de réponse à SP1 (Stimulating protein 1) et des sites de liaison aux éléments de réponse à l'AMP-cyclique (Cyclic AMP responsive elements, CRE) (Lemee et al., 2007). De plus, les gènes murins et humains sont sous le **contrôle de deux XRE** (xenobiotic responsive element). Chez la souris, le gène est surexprimé en réponse à l'exposition à des composés aromatiques comme les dioxines ou le benzopyrène B(a)P (Ogi et al., 2001).

L'expression de Pol κ semble être sous le **contrôle de p53**. Les radiations UV induisent la surproduction de l'ARNm dans la peau de souris sous le contrôle de p53 (Velasco-Miguel et al., 2003). Chez l'homme, la situation est différente: le traitement des cellules humaines aux radiations ionisantes, aux UV, au BPDE, H₂O₂ ou cisplatine (Velasco-Miguel et al., 2003;

Burns and El-Deiry, 2003) n'affecte pas le taux de ARNm. Cependant, p53 semble impliquée tout de même dans la régulation du gène humain. Dans trois lignées cellulaires de cancer du poumon, la transfection de *p53* réprime l'expression de *POLK* (Wang et al., 2004). **L'inactivation de p53 dans les cellules humaines pourrait contribuer à la surexpression de Polk dans certains cancers humains** (Wang et al 2004). **La surexpression de Pol κ dans les cellules de souris ou dans les fibroblastes humains MRC5 augmente la fréquence de mutations spontanées** au niveau du locus *HPRT* (Ogi et al., 1999; Bergoglio et al., 2002). De plus, la surexpression stable de Pol κ dans les cellules CHO **augmente la présence de cassures double-brin de l'ADN** ainsi que les **événements de recombinaison homologue ou non homologue** (Bavoux et al., 2005). En outre, les **pertes d'hétérozygotie et l'aneuploïdie** sont deux phénotypes induits par la surexpression de Pol κ (Bavoux et al., 2005). En accord avec ces résultats, la surexpression de Pol κ combinée à l'absence d'une protéine p53 fonctionnelle induit la tumorigenèse chez la souris nude (Bavoux et al., 2005). Enfin, un excès de Polk induit la formation de segments répliqués plus courts, ce qui implique que la vitesse de réplication est plus faible (Pillaire et al., 2007). **Un excès de Pol κ pourrait interférer avec la réplication normale de l'ADN** (soit en interférant avec les ADN polymérases réplicatives, soit en interagissant avec d'autres facteurs essentiels à la réplication), **rendant ce processus mutagène et générant des cassures double-brin de l'ADN**.

Une étude a cependant montré que, dans les cancers colorectaux, Polk est sous-exprimée (Lemee et al., 2007). L'impact de cette dérégulation n'est pas connue.

Il est donc important que le niveau d'expression de cette ADN polymérase soit fortement régulé.

b. Les domaines de Polk et les interactions avec des protéines

La polymérase translésionnelle Polk contient:

- un **domaine catalytique** localisé dans le domaine N-terminal de la protéine (Gerlach et al., 1999; Ogi et al., 1999).
- un **domaine PIP** situé dans la partie C-terminale de Pol κ. Pol κ interagit avec PCNA qui stimule son activité mais pas sa processivité (Haracska et al., 2002a). La co-localisation au niveau de foyers de réplication de PCNA et Pol κ dans les cellules confirme l'interaction de ces deux protéines (Bergoglio et al., 2002).
- **deux domaines de liaison à l'ubiquitine (UBZ)** dans la partie C-terminale (Bienko et al., 2005) nécessaires pour l'interaction avec PCNA ubiquitiné (Guo et al., 2008; Bi et al., 2006).

- la région 560-615 **interagit avec Rev1** (Ohashi et al., 2004; Guo et al., 2003). Les phénylalanines 567 et 568 sont requises pour cette interaction (Ohashi et al 2009). Un mutant qui ne peut plus interagir avec Rev1 ne complémente pas la sensibilité aux UV ou au BPDE des fibroblastes de souris déficientes en Polk, ce qui indique que cette interaction est essentielle pour l'activité de Polk *in vivo* (Ohashi et al., 2009).
- une étude a montré que Polk encercle l'ADN grâce à un **domaine N-clasp** en N terminal (résidus 21 à 74), qui stabilise la liaison avec l'ADN (Lone et al., 2007) (Figure 37).

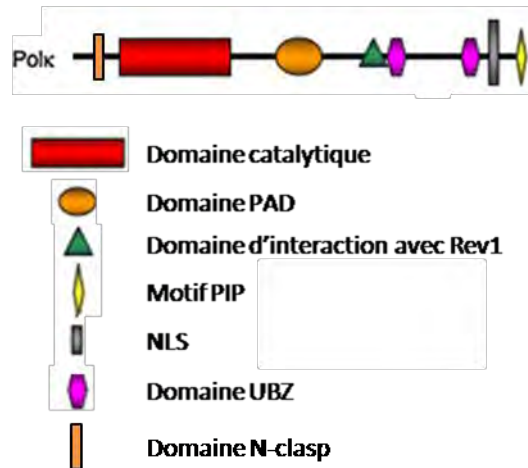


Figure 37: Les domaines de Polk. Adapté de Guo et al., 2009.

Chez *S. pombe*, une interaction de **Polk avec Hus1 et Rad1** du complexe Hus1-Rad1-Rad9 (9-1-1) a été mise en évidence (Kai and Wang, 2003a). Cette interaction suggère qu'après dommages de l'ADN, 9-1-1 permettrait le recrutement de Polk au niveau des sites de dommages.

c. Localisation aux foyers de réplication

Dans des conditions normales, Polk est distribuée en foyers où colocalise PCNA dans 20% des cellules. La localisation est diffuse dans le noyau des 80% restantes (Bergoglio et al. 2002).

Polk est présente dans des foyers dans les **cellules traitées avec des UV, le BPDE** ou le cisplatine (Bergoglio et al., 2002 ; Bassett et al., 2004; Ogi et al., 2005; Bi et al., 2005; Guo et al., 2008). Comme pour Pol η et Pol ι , les domaines **UBZ** de Polk sont critiques pour l'accumulation de Polk dans les foyers de réplication quand les cellules souffrent de dommages (Guo et al., 2008). De plus le domaine **PIP** et le motif **NLS** sont requis pour les foyers nucléaires de Polk après dommages (Ogi et al., 2005). La fraction de cellules humaines

avec des foyers Polk est plus faible que celle des cellules murines après UV (Guo et al., 2008).

d. Les fonctions de Polk

Pol κ est **incapable de répliquer les lésions induites par le cisplatine** (Gerlach et al., 2001; Ohashi et al., 2000) et **les lésions induites par les UV** que ce soient des photoproduits 6-4 ou des dimères de thymines (CPD) (Ohashi et al., 2000; Zhang et al., 2000b). Si Polk ne peut franchir les CPD (Ohashi et al., 2000), une étude a pourtant montré que dans les cellules XPV, c'est-à-dire en l'absence de Pol η , Polk est impliquée dans le franchissement des CPD avec Pol ι et Pol δ (Ziv et al., 2009).

Des tests de réplication de sites abasiques ont donné des résultats contradictoires. Dans la première étude (Johnson et al., 2000c), Pol κ ne réalise aucune TLS alors que dans trois autres études (Zhang et al., 2000d; Ohashi et al., 2000; Wolfle et al., 2003), Polk insère un A avec une efficacité 250 fois moins importante que sur un ADN non endommagé.

De plus, **Pol κ jouerait un rôle au niveau des bases oxydées ou des adduits aromatiques**. Pol κ réalise de la TLS fidèle en face d'une **8-oxo-guanine** (Zhang et al., 2000b), d'une **éthéno-désoxyadenine** (Levine et al., 2001), d'un **thymine glycol** (Fischhaber et al., 2002), d'un **BPDE-dG** (Suzuki et al., 2002; Zhang et al., 2000b), de **lésions AF-dG ou AAF-dG** (Gerlach et al., 2001; Suzuki et al., 2002; Zhang et al., 2000b). En accord avec ces résultats, les cellules déficientes en Pol κ sont plus sensibles au benzopyrène (BPDE) et présentent une mutagénèse plus importante que les cellules contrôles (Ogi et al., 2002). De plus, les cellules déficientes en Pol κ sont arrêtées en phase S après traitement au BPDE et présentent une augmentation des cassures double-brin de l'ADN (Bi et al., 2005). L'utilisation de cellules de souris déficientes en Pol κ a permis de montrer que **Pol κ est responsable des deux tiers de la TLS des adduits BPDE**. Cette synthèse est fidèle à 70% dans les cellules de souris et à 90-100% dans les cellules humaines (Avkin et al., 2004).

Polk a un rôle dans **l'hypermutation somatique en absence de Pol η** (Faili et al., 2005). Elle serait peut être aussi impliquée dans le **mécanisme de réparation par excision de nucléotides NER**. En effet, les cellules murines déficientes pour Polk sont sensibles aux UV et présentent une réduction importante de la synthèse lors du mécanisme de NER. D'autre part, la protéine mutée dans son domaine catalytique ne peut compléter ces phénotypes (Ohashi et al., 2000; Ogi and Lehmann, 2006). Polk n'étant pas capable de répliquer *in vitro*

des lésions induites par les UV, Polk pourrait alors être impliquée dans le mécanisme principal de réparation de ces lésions, NER.

5. La plate-forme Rev1

REV1 n'est pas une ADN polymérase à proprement parler mais une déoxycytidyl-transférase (d-CMP). Rev1 est capable d'insérer des dCMP en face de guanines et de certaines lésions comme des sites abasiques et des résidus guanines portant des adduits (Ohmori et al., 2001; Lawrence, 2002; Washington et al., 2004). Le gène humain *REV1* est localisé au niveau du chromosome 2q11.1-11.2 et présente environ 40% d'homologie de séquence avec le gène correspondant chez la levure (Lin et al., 1999; Gibbs et al., 2000). Ce gène code pour une protéine de 128 kDa (Lin et al., 1999).

a. Expression et régulation

La **transcription de Rev1 augmente durant la méiose** chez *S. cerevisiae* (Burns et al., 1994.; Chu et al., 1998). Chez l'homme, Rev1 est plus fortement exprimée dans le testicule que dans les autres tissus (Murakumo et al., 2000), ce qui indique que Rev1 pourrait avoir une fonction durant la méiose.

Chez *S. cerevisiae*, la quantité de Rev1 est maximale durant la phase G2 (Waters and Walker, 2006; Sabbioneda et al., 2007). De plus, **Rev1 est phosphorylée en phase S et hyperphosphorylée pendant la mitose**. L'hyperphosphorylation est aussi visible lorsque les cellules sont irradiées aux UV ou traitées avec du 4NQO ou de la zéocine. Mec1 (homologue d'ATR) est impliquée directement ou indirectement dans cette modification. La phosphorylation de Rev1 contribuerait en partie à la mutagenèse induite par les UV (Pagès et al., 2009).

Chez les mammifères, la concentration de la protéine n'est pas affectée par les UV ou la progression du cycle cellulaire (Akagi et al., 2009).

Chez la souris, Rev1 est mono-ubiquitinée, mais le mécanisme de l'ubiquitination, l'acide aminé visé dans la protéine et l'intérêt fonctionnel de cette modification restent pour le moment inconnus (Guo et al., 2006b; Mirchandani et al., 2008).

b. Interactions protéiques

Rev1 possède plusieurs modules d'interaction protéine-protéine, tous requis individuellement pour sa fonction *in vivo* (Figure 38):

- un **domaine BRCT** en N-terminal. Le domaine BRCT, initialement caractérisé dans la protéine BRCA1, a ensuite été identifié dans une grande variété de protéines associées à la régulation du cycle cellulaire et aux réponses cellulaires après dommages sur l'ADN (Callebaut and Mornon, 1997; GLover et al., 2004). Le domaine BRCT permet **l'interaction de Rev1 avec PCNA et la sous-unité Rev7 de Pol ζ** (Masuda et al 2003; D'Souza and Walker, 2006; Guo et al 2006a). Le domaine BRCT pourrait aussi participer à la localisation de Rev1 au niveau de la chromatine en permettant l'association avec des protéines phosphorylées (Sabbioneda et al., 2007).

Les mutations affectant le domaine BRCT inactivent Rev1 *in vivo*, chez la levure (Lemontt, 1971; Larimer et al., 1989; Gibbs et al., 2000) et chez les eucaryotes supérieurs, même si l'ampleur de la perte de fonction dépend des études (Jansen et al., 2005; Ross et al., 2005; Guo et al., 2006a). Les cellules ES *Rev1^{B/B}* (délétion pour le domaine BRCT) présentent une fréquence élevée de délétions intragéniques spontanées dans le locus *Hrpt*, un délai de la progression pendant les phases S et G2 et de nombreuses aberrations des chromatides après un traitement aux UV. La mutagenèse induite est réduite et les mutations au niveau des dimères de thymine sont absentes, ce qui est l'exact opposé du phénotype des cellules XP-V irradiées aux UV. **La mutagenèse induite par les UV dans les cellules XPV dépendrait donc de Rev1** (Jansen et al., 2005).

- les **100 acides aminés de l'extrémité C-terminale**. Grâce à ce domaine, Rev1 **interagit avec les polymérases translésionnelles Pol η , Pol ι , Pol κ et Pol ζ** (Murakumo et al., 2001; Guo et al., 2003; Ohasi et al., 2004; Tissier et al., 2004). L'interaction de Rev1 avec Rev3 stimule l'élongation par Pol δ en face d'un mésappariement ou d'une lésion de l'ADN *in vitro* (Acharya et al., 2006). Chez la levure ou les mammifères, la protéine sans son C terminal ne permet pas la complémentation d'une souche *$\Delta rev1$* après dommages de l'ADN (Larimer et al., 1989; Ross et al., 2005; Acharya et al., 2006; D'Souza et al., 2008; Kosarek et al., 2008). Dans les cellules humaines, **l'interaction de Pol η et de Rev1 par l'intermédiaire du domaine d'interaction avec les polymérases serait importante pour éviter les mutations spontanées, probablement en favorisant la TLS fidèle des lésions endogènes de l'ADN tandis que cette interaction ne serait pas nécessaire pour le rôle de Pol η dans la TLS des dommages induits par les UV** (Akagi et al., 2009). Par contre, dans les DT40, ce domaine

est nécessaire pour le maintien de la progression des fourches lorsque l'ADN est endommagé, ce qui indique que l'interaction de Rev1 avec les autres ADN polymérases translésionnelles est requis pour sa fonction (Edmunds et al; 2008). Il a alors été proposé que **la TLS au niveau d'une fourche de réplication bloquée requiert Rev1 en tant que plateforme pour le recrutement des ADN polymérases translésionnelles nécessaires pour le franchissement de la lésion** (Edmunds et al; 2008).

- les domaines UBM (ubiquitin binding motifs), grâce auxquels **Rev1 lie l'ubiquitine** (Guo et al., 2006b). L'interaction avec l'ubiquitine est nécessaire pour la localisation de Rev1 dans les foyers induits par les dommages (Guo et al., 2006b) et pour la stimulation de son activité catalytique par PCNA mono-ubiquitiné (Wood et al., 2007). Dans les cellules exprimant des mutants des domaines UBM, on observe une augmentation des aberrations chromosomiques, une baisse de la viabilité et de la mutagenèse après exposition à différents agents endommageant l'ADN (Guo et al., 2006b; Wood et al., 2007; D'Souza et al., 2008;), ce qui implique que le **domaine UBM est nécessaire pour la fonction de Rev1 *in vivo***.

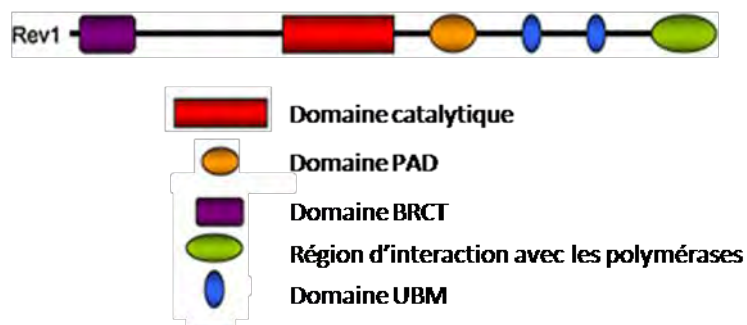


Figure 38: Les domaines de Rev1. Adapté de Guo et al., 2009

c. Localisation aux foyers

Dans les cellules humaines non traitées, Rev1 forme des foyers nucléaires qui colocalisent avec PCNA. **Rev1 est donc présent de manière constitutive aux foyers de réplication** (Tissier et al., 2004; Murakumo et al., 2006). Rev1, Pol η et Rad18/Rad6 forment un complexe dans les extraits cellulaires HeLa en réponse aux UV (Yuasa et al., 2006). L'interaction de Rev1 et Pol η dans la chromatine est stimulée par l'arrêt de la réplication par déplétion des nucléotides ou des lésions (Yuasa et al., 2006). Une étude a aussi montré que Rev1 a besoin d'interagir avec Pol η pour former des foyers après UV (Akagi et al., 2009). En

revanche, l'interaction de Rev1 avec les autres ADN polymérases translésionnelles n'est pas nécessaire pour leur relocalisation en réponse aux dommages de l'ADN (Kannouche et al., 2001; Vidal et al., 2004; Ogi et al., 2005).

Rev1 pourrait être **fonctionnel dans un contexte non répliatif** (Murakumo et al., 2006; Akagi et al., 2009). En effet, Rev1 forme des foyers en dehors de la phase S (Murakumo et al., 2006) et colocalise avec Pol η aux sites de dommages UV en dehors de la phase S (Akagi et al., 2009).

d. Rôles

- Rôle dans la mutagenèse

Un mutant inactivant l'activité de Rev1 ne présente **pas de diminution des niveaux de mutagenèse induite par un grand nombre d'agents endommageant l'ADN**, y compris les rayons UV (Haracska et al., 2001c; Ross et al., 2005), impliquant que **cette protéine est requise indépendamment de son activité**. Ainsi, Rev1 est requis avec Pol δ pour la **mutagenèse spontanée et induite par des dommages chez la levure** (Lawrence, 2002), **l'homme** (Gibbs et al., 2000; Clark et al., 2003; Mukhopadhyaya et al., 2004) **et la souris** (Poltoratsky et al., 2005).

Un modèle a alors été développé dans lequel **Rev1 recrute et coordonne d'autres facteurs impliqués dans la tolérance aux dommages aux sites de lésion plutôt que de franchir les lésions directement** (Haracska et al., 2001; Guo et al., 2003; Tissier et al., 2004).

- Activité déoxycytidyl-transférase

REV1 possède une activité **déoxycytidyl-transférase** (d-CMP) que ce soit chez la levure ou dans les cellules humaines (Nelson et al., 1996a; Lin et al., 1999). Ainsi, cette protéine catalyse l'insertion de dCMP en face des **sites abasiques**, des **8-oxo-guanines**, des **adduits benzopyrène sur des guanines**, mais n'est pas capable de réaliser de la TLS au niveau des lésions induites par les radiations UV (Nelson et al., 1996a; Haracska et al., 2001c; Haracska et al., 2002b; Zhang et al., 2002). Sur une matrice poly(dG), Rev1 synthétise de l'ADN, *in vitro*, en incorporant des C et incorpore environ deux nucléotides par événements de liaison à l'ADN. Rev1 peut aussi insérer des C en face des autres bases de l'ADN avec des fréquences comprises entre 10^{-3} et 10^{-4} (Haracska et al., 2002b).

Dans les souris déficientes en Rev1, des transversions C→G ont été observées, suggérant que Rev1 incorpore, au cours de l'**hypermutation somatique**, des C en face des uraciles produits

lors de la déamination des deoxy-cytidines par l'action d'AID (Jansen et al., 2006). Ces résultats ont aussi été retrouvés dans les cellules de poulet DT40 déficientes en Rev1 (Ross and Sale, 2006).

6. Pol ζ

Pol δ est un **hétérodimère composé de la sous unité catalytique Rev3 et la sous unité accessoire Rev7** (Nelson et al., 1996b). Contrairement à la majorité des polymérases TLS qui appartiennent à la famille Y, Pol δ est un membre de la famille B, qui inclut les ADN polymérases réplicatives δ , ϵ et α (Morrisson et al., 1989; Lawrence, 2004). Elle ne possède pas les motifs caractéristiques d'une activité 3'-5' exonucléase (Lawrence, 2004).

Rev3 ne contient aucun module connu d'interaction protéine-protéine ou de motif de régulation. Rev7 contient un **domaine HORMA** (Hop1/Rev7/Mad2) d'interaction avec la chromatine (Aravind and Koonin, 1998) (Figure 39).

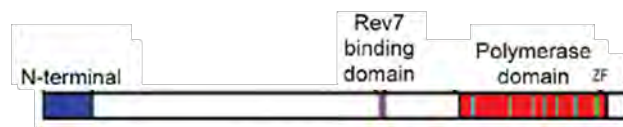


Figure 39: Structure de Rev3. Adapté de Gan et al 2008.

Chez *S. cerevisiae*, **Rev7 interagit avec 9-1-1** et cette interaction pourrait entraîner le recrutement de Pol δ aux sites de dommages de l'ADN (Sabbioneda et al., 2005). De plus, Rev7 interagit avec **Rev1** (Ohashi et al., 2000; Murakumo et al., 2001; Guo et al., 2003; Takeuchi et al., 2004; Tissier et al., 2004; Hara et al., 2010).

L'architecture du complexe Pol δ -Rev1 est compliquée et plusieurs sous-complexes existent peut-être de manière régulée. Bien que les 3 protéines interagissent les unes avec les autres, un hétérotrimère de Rev1, Rev3 et Rev7 n'est pas formé quand on purifie les protéines, la liaison entre Rev1 et Rev7 inhibant l'interaction de Rev1 et Rev3 purifiés *in vitro* (Acharya et al., 2006). Il est possible que des modifications post-traductionnelles de Rev1 influencent la nature de son interaction avec Pol δ *in vivo*.

La sous-unité accessoire Rev7 augmente significativement l'activité de polymérase de Rev3 (Nelson et al., 1996b). Bien que ne possédant **pas des motifs d'interaction avec PCNA**, **Pol ζ présente une activité plus élevée en présence de PCNA** (Garg et al., 2005). Cependant, cette stimulation de l'activité de Pol δ n'est pas observée en présence de PCNA mono-ubiquitiné.

- Rôle dans la TLS

Une analyse systématique de sept types de dommages de l'ADN très différents a impliqué Polζ dans la TLS de toutes les lésions sauf des TT-CPD lors de l'étape d'élongation (Ziv et al., 2009; Livneh et al., 2010;) (Figure 40). Pour un certain nombre de lésions de l'ADN, deux polymérases translésionnelles seraient donc requises, l'une pour l'insertion d'un nucléotide en face de la lésion et l'autre pour l'élongation.

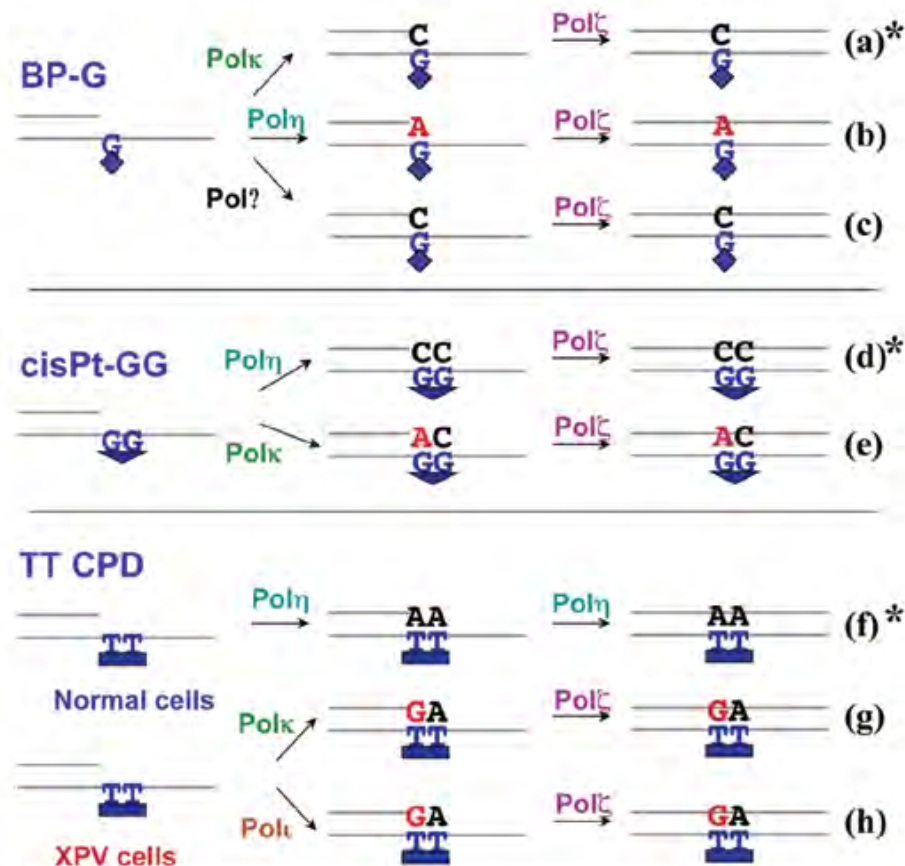


Figure 40: Les ADN polymérases impliquées dans le franchissement de différentes lésions. Polζ est impliqué dans l'élongation, tandis que Polη, Polt et Polk sont impliqués dans l'étape d'insertion en face de la lésion. * indique la réaction de TLS prédominante. Livneh et al., 2010.

- Rôle dans la mutagenèse

Chez *S.cerevisiae*, la délétion du gène *REV3* est la cause d'une augmentation de la sensibilité aux radiations UV et à certains agents chimiques endommageant l'ADN (Lawrence et al., 1984; Morrison et al., 1989; Pavlov et al., 2001). La conséquence la plus importante de l'absence de Rev3, chez la levure, est la **réduction de 90%** de la fréquence des substitutions des paires de base et des mutations frameshift induites par les UV. La mutagenèse induite par les rayons γ et le méthylméthane sulfonate est aussi diminuée dans les mutants *rev3* (Morrison et al., 1989; Lawrence and Hinkle, 1996; Lawrence, 2002). Chez la levure, Rev3

est impliquée dans la mutagenèse durant la recombinaison. La recombinaison intrachromosomique entre les séquences répétées inversées et la recombinaison interchromosomique peuvent être stimulées en créant des cassures double-brins entre les répétitions avec la nucléase HO. On peut alors observer des frameshifts et des substitutions de bases associées à l'évènement de recombinaison (Holbeck and Strathern, 1997; Ratteay et al., 2002). Dans les cellules *Rev3*^{-/-}, la réparation des cassures double-brins a toujours lieu mais 75 à 80% des mutations associées n'apparaissent pas (Holbeck and Strathern, 1997; Ratteay et al., 2002; Hirano et al., 2006; Hirano et al., 2008). Tous ces résultats indiquent que **la majorité des évènements mutagènes chez la levure implique Polζ**.

- Rôle dans la recombinaison

Les cellules de fibroblastes humains exprimant des ARN antisens contre *Rev3* ou *Rev1* ont montré que la recombinaison homologue spontanée ou induite par des dommages y était moins présente (Wu et al., 2004). Une autre lignée cellulaire *Rev7* KD est très sensible au cisplatine et aux radiations γ et la mutagenèse y est réduite (Cheung et al., 2006). Une augmentation des aberrations chromosomiques et une diminution des échanges de chromatides sœurs ont pu être observées, en réponse à des dommages. La sensibilité accrue au cisplatine et la diminution de la recombinaison homologue dans les cellules humaines *REV1*, *REV3* et *REV7* KD sont autant d'indices pour suggérer que ces 3 protéines sont impliquées dans la **recombinaison**.

Des résultats plus contrastés ont été obtenus dans les DT40. La perte d'une seule de ces protéines provoque une augmentation de la fréquence des échanges de chromatides, spontanément ou en réponse aux UV ou au 4-nitroquinolone-1-oxyde (Sonoda et al., 2003; Okada et al., 2005). Une autre étude a montré que l'absence de *Rev3* entraîne une diminution des échanges chromosomiques après un traitement au 4-nitroquinolone-1-oxyde mais pas après un traitement à la mitomycine C ou au cisplatine (Niedzwiedz et al., 2004).

- Autres rôles

La **perte de Polζ est la cause d'une létalité embryonnaire chez la souris**, ce qui indique que durant la prolifération, les cellules de mammifères ont besoin d'une fonction de Polδ (Bemark et al., 2000; Esposito et al., 2000; Wittschieben et al., 2000; Van Sloun et al., 2002).

Polδ joue aussi un **rôle dans la réparation des pontages intra et inter-brin** dus à la mitomycine B, au sporalène et au cisplatine (Shen et al 2009; Hicks et al 2009).

B. Les modèles de la synthèse translésionnelle

L'ensemble des études détaillées ci-dessus a mené à l'élaboration de **deux modèles** pour la TLS, l'un **au niveau de la fourche ("polymerase switching")** (Plosky and Woodgate 2004; McCulloch et al., 2004; Friedberg et al., 2005; Prakash et al 2005; Lehmann and Fuchs, 2006; Lehmann et al., 2007; McCulloch and Kunkel, 2008; Andersen et al., 2008; Lee and Myung, 2008; Chang and Cimprich, 2009; Ulrich, 2009) et l'autre **au niveau des brèches d'ADN simple-brin résultant du redémarrage de la fourche de réplication en aval de la lésion ("gap-filling")** (Lehmann, 2006; Lopes et al., 2006; Lehmann and Fuchs, 2006; Waters and Walker, 2006; McCulloch and Kunkel 2008; Edmunds et al 2008; Jansen et al., 2009a; Jansen et al 2009b).

1. Echange des ADN polymérase à la fourche de réplication

L'échange de polymérase a lieu au niveau de la fourche de réplication pour permettre à la réplication de continuer, en franchissant les lésions qui bloquent les ADN polymérase répliquatives. PCNA, qui interagit à la fois avec les ADN polymérase répliquatives et translésionnelles joue le rôle de plateforme.

Le rôle de la mono-ubiquitination de PCNA dans ce modèle est sujet à discussion:

- Stabilisation du complexe polymérase translésionnelles/PCNA

Pol η , Pol ι et Pol κ interagissent avec PCNA via le motif consensus PIP (PCNA interacting domain). De plus, toutes les ADN polymérase de la famille Y possèdent un ou plusieurs domaines de liaison à l'ubiquitine. Ainsi, Pol η et Pol κ contiennent un domaine UBZ (Ubiquitin Binding Zinc Finger), tandis que Pol ι et REV1 contiennent respectivement un et deux UBM (Ubiquitin binding motif) (Bienko et al., 2005). Au vu de l'existence de ces deux domaines UBM/UBZ et PIP, il a été postulé que l'interaction entre UBM/UBZ et l'ubiquitine de PCNA stabiliserait le complexe polymérase translésionnelles/PCNA. Ainsi, l'activité de Pol η et Rev1 est augmentée en présence de PCNA mono-ubiquitiné dans un système *in vitro* de protéines purifiées de levure (Garg and Burgers, 2005). Une autre étude n'est cependant pas arrivée à la même conclusion (Harascka et al., 2006). Il a aussi été montré que l'échange

entre Pol δ et Pol η nécessite l'arrêt de la réplication et la mono-ubiquitination de PCNA dans un système de levure reconstitué (Zhuang et al., 2008).

- Déstabilisation d'autres protéines

La mono-ubiquitination de PCNA inhiberait la réplication normale en déstabilisant d'autres protéines associées avec PCNA qui devient alors accessible aux polymérase translésionnelles (Haracska et al., 2006).

- Aucun rôle

La TLS aux fourches bloquées après irradiation aux UV nécessite Rev1, l'intégrité des domaines UBM et du domaine d'interaction avec les autres polymérase translésionnelles. Elle ne requiert pas l'ubiquitination de PCNA qui devient nécessaire pour le comblement des brèches d'ADN simple-brin créées par le redémarrage de la réplication en aval de la lésion (Edmunds et al., 2008).

Enfin, une fois la lésion franchie, un nouvel échange a lieu. La réplication reprend et la fourche de réplication redémarre (Figure 41). La lésion pourra par la suite être la cible des mécanismes de réparation.

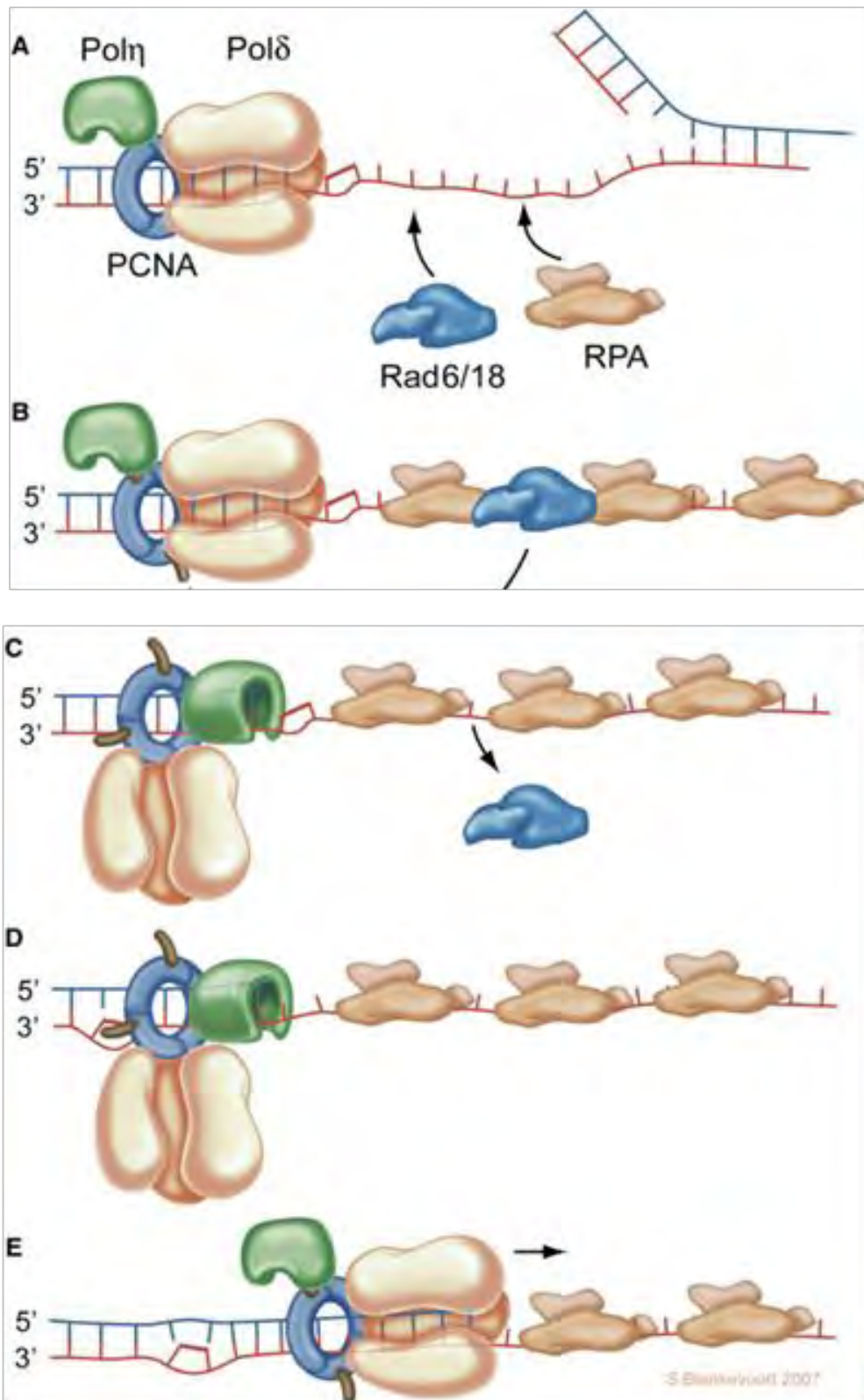


Figure 41: Modèle d'échange de polymérase. **A.** La polymérase répliquative est bloquée au niveau d'une lésion de l'ADN. RPA et Rad6/Rad18 sont recrutés, en aval de la lésion, au niveau de l'ADN simple-brin. **B.** Rad6/Rad18 ubiquitine PCNA. **C.** La polymérase translésionnelle prend alors la place de la polymérase répliquative. **D.** Elle insère un ou quelques nucléotides à l'opposé de la lésion. **E.** Un second échange de polymérases permet à la polymérase répliquative de reprendre sa place et la répliquation de l'ADN redémarre. Jansen et al., 2007.

2. Réaction de TLS au niveau des brèches d'ADN simple-brin

Le modèle de "gap-filling" a été proposé pour rendre compte de la **TLS en dehors du contexte de la fourche de réplication, quand les dommages de l'ADN résident dans des brèches d'ADN simple-brin.**

L'ADN simple-brin résultant du découplage de la polymérase répliquative bloquée et de l'hélicase ne permet pas simplement le recrutement du complexe Rad6/Rad18 mais aussi de la kinase ATR qui se lie avec son partenaire ATRIP sur RPA (Byun et al., 2005). Si ces deux événements sont indépendants (Chang et al., 2006; Frampton et al., 2006; Niimi et al., 2008), ils pourraient cependant être étroitement mêlés.

En effet, d'une part **la TLS prévient l'activation du checkpoint.** Différentes études ont montré que l'absence des protéines impliquées dans la TLS comme Rad18, Pol η , Rev1, Rev3 ou Rev7 entraîne une sur-activation du checkpoint (Bomgardner et al. 2006; Holway et al., 2006 chez *C.elegans*; Hicks et al., 2009 dans des HeLa; Despras et al., 2010 dans les cellules XPV). Enfin, chez la levure, dans des conditions CLUV (chronic low dose ultraviolet light), des brèches d'ADN simple brin s'accumulent dans des mutants *rad18* mais pas dans les cellules normales, ce qui entraîne l'activation du checkpoint et un arrêt de la progression dans le cycle cellulaire en G2 (Hishida et al., 2008). On peut observer cette coordination dans les cellules de mammifères déficientes à la fois en Rev1 et en NER. Le traitement de ces cellules aux UV est la cause d'une activation du checkpoint et d'un arrêt irréversible en phase G2 en raison de l'accumulation de brèches post-répliquatives à l'opposé des photoproduits (Jansen et al., 2009a).

D'autre part, **l'activation du checkpoint favoriserait la TLS.** Des études chez *S. cerevisiae* et *S.pombe* ont impliqué **9-1-1 dans la régulation de la synthèse translésionnelle mutagène réalisée par Pol ζ** (Paulovitch et al., 1997; Kai and wang, 2003a) et **Polk** (Kai and Wang, 2003b). De plus, Rev1 interagit aussi avec 9-1-1 (Sabbioneda et al., 2005). Enfin, chez *S. cerevisiae*, **la phosphorylation de Rev1 par ATR contribuerait en partie à la mutagenèse induite par les UV.** Lorsque les fonctions des ADN polymérases translésionnelles sont coordonnées avec la réplication, le franchissement de la lésion sera rapide et efficace et l'arrêt de la fourche ne persistera pas assez longtemps pour activer ATR.

Par contre, si la fourche redémarre en aval de la lésion, ATR sera activé et Rev1 sera phosphorylée, peut être par l'intermédiaire de son interaction avec 9-1-1 (Pages et al., 2009).

Suivant le modèle, le recrutement de 9-1-1 à la jonction 5' créé par le redémarrage de la réplication en aval de la lésion permettrait non seulement le recrutement d'ADN polymérase translésionnelles (Rev1, Pol ζ et Pol κ) (Paulovitch et al., 1998; Kai and Wang, 2003a et b; Sabbionedda et al., 2005) mais aussi l'activation d'ATR (Yan and Michael, 2009). Au niveau d'une brèche d'ADN simple-brin portant une lésion, la TLS et le checkpoint pourraient donc être coordonnés. Le checkpoint active la TLS post-répllicative et la TLS pourrait annuler le signal ATR en comblant la brèche (Figure 42).

Enfin, chez *S. cerevisiae*, une étude a montré que l'absence de la mono-ubiquitination de PCNA (due à la mutation K164R) n'affecte pas la progression de la phase S dans des cellules où la sous-unité Pol32 de Pol δ est délétée, induisant des problèmes de réplication. De plus, l'expression de Rad18 et des polymérase translésionnelles Pol ζ et Pol η complémente la sensibilité aux UV et au MMS des cellules déficientes pour ces trois protéines même si leur expression est limitée à la phase G2 du cycle cellulaire (Karas and Jentsch, 2010). D'après cette étude, la TLS dépendante de la mono-ubiquitination de PCNA n'est pas impliquée dans le franchissement des lésions au cours de la réplication mais lors du comblement des brèches d'ADN simple-brin générées par le redémarrage des fourches de réplication en aval des lésions (Karas and Jentsch, 2010).

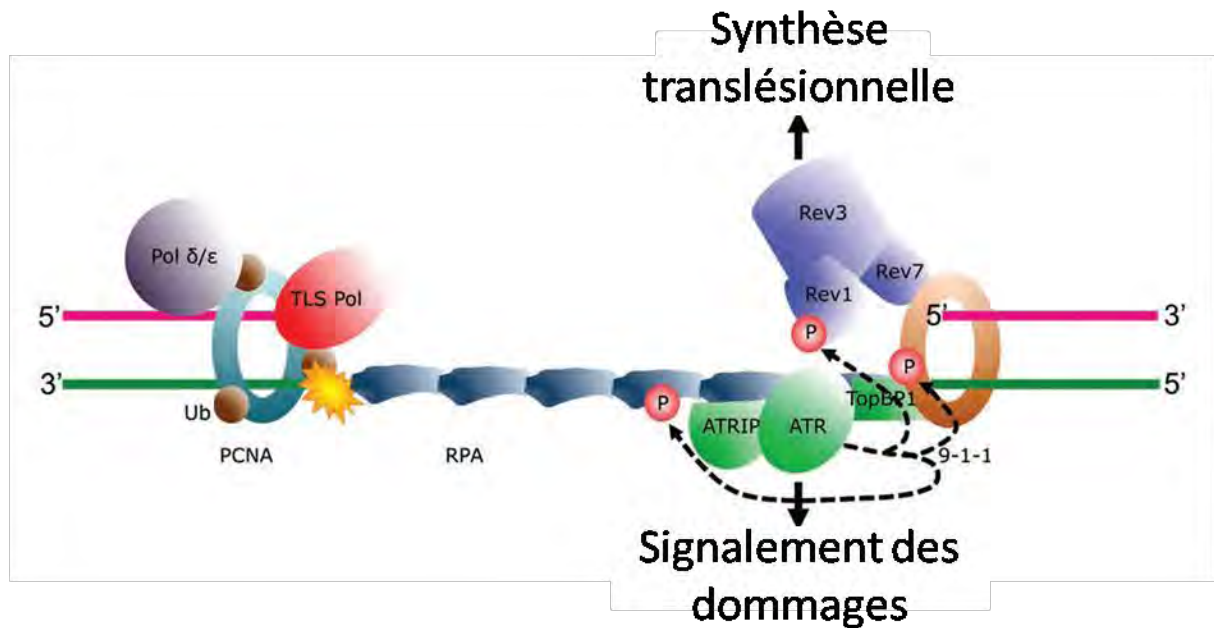


Figure 42: Modèle post-répliatif de la TLS. Le redémarrage de la réplication en aval d'une lésion de l'ADN, qui a causé l'arrêt de la polymérase répliatrice et peut être aussi l'arrêt d'une polymérase translésionnelle, crée une jonction 5' qui permet le recrutement de 9-1-1 par TopBP1. Dans le cas de la réplication d'un brin discontinu, le brin d'Okazaki adjacent pourrait servir. De manière simultanée, ATR et ATRIP sont recrutés au niveau de l'ADN simple-brin associé à RPA. ATR/ATRIP sera activé par TopBP1 et 9-1-1. Chez *S. cerevisiae*, Rev1, 9-1-1, RPA et Chk1 (qui n'est pas représenté) sont les cibles d'ATR. Le complexe Rev1/Rev3/Rev7, grâce à son association avec 9-1-1 et la modification de Rev1, pourrait alors se déplacer vers la jonction 3' et franchir la lésion (Masuda and Kamiya 2006). ub: ubiquitine. Adapté de Jansen et al 2009b.

3. Retour de l'ADN polymérase répliatrice

Chez le nématode, la **dégradation de POLH-1** (orthologue de Pol η) permettrait son départ de la fourche de réplication après la TLS. Nous ignorons si une telle régulation est conservée dans les cellules de mammifères (Kim and Michael, 2008).

Une autre étude a aussi proposé que la protéine **WRNIP1**, identifiée comme une protéine qui interagit avec l'hélicase WRN, dont la déficience est responsable du syndrome de Werner (Hishida et al., 2001), serait impliquée dans le second échange de polymérases. En effet, WRNIP1, interagit avec Pol δ (Tsurimoto et al., 2005) et Rad18 (Yoshimura et al., 2009). WRNIP1 interfère avec la liaison de Rad18 avec l'ADN: cette protéine reconnaît préférentiellement le complexe ADN-Rad18 via une interaction avec Rad18 et se lie avec l'ADN, probablement en déplaçant Rad18. Les auteurs proposent que WRNIP1 pourrait être impliqué dans le deuxième échange de polymérase en étant **recrutée par Rad18 et mobilisée par la suite Pol δ** (Yoshimura et al., 2009).

Enfin, dans un système avec des protéines purifiées *in vitro*, le complexe Ub-PCNA/Pole inhibe la synthèse d'ADN par Pol δ . La dé-ubiquitination de PCNA pourrait alors être requise pour le remplacement de Pole par Pol δ après le franchissement d'une lésion

(Zhuang et al., 2008). Cependant, *in vivo*, il a été montré que PCNA mono-ubiquitiné persiste 72 heures après un traitement aux UV ou au MMS (Niimi et al., 2008). Niimi et ses collaborateurs ont alors proposé que les polymérase translésionnelles quitteraient alors peut être simplement l'ADN en raison de leur faible processivité. Le retour de la polymérase répliquative peut aussi nécessiter le chargement d'une **nouvelle molécule de PCNA**.

3. Objectifs de mon travail de thèse

L'équipe « Mécanismes de tolérance des dommages à l'ADN », qui m'accueille depuis quatre ans, s'emploie à comprendre le processus de mutagenèse induite par la présence de lésions sur l'ADN. L'organisation des échanges entre les différentes ADN polymérases, la régulation de leur activité ainsi que leur interaction avec le complexe réplcatif constituent les thématiques principales abordées dans notre équipe.

J'ai étudié au cours de ma thèse **l'implication de PCNA** (Proliferating Cell Nuclear Antigen), facteur de processivité de l'ADN polymérase réplcative Pol δ , qui, comme nous l'avons décrit dans cette introduction, interagit non seulement avec Pol δ mais aussi avec l'ensemble des ADN polymérases translésionnelles et pourrait servir de plate-forme sur laquelle les différentes ADN polymérases viendraient s'échanger. De plus, chez *S. cerevisiae* et dans les cellules humaines, PCNA est mono-ubiquitiné par le complexe Rad6/Rad18, en réponse à des agents qui bloquent la fourche de réplcation. Le rôle exact de cette modification dans le processus de TLS est controversé. Dans ce contexte, **mon travail de thèse a consisté, d'une part, à étudier le mécanisme d'activation de Rad6/Rad18, et d'autre part, à comprendre le rôle de la mono-ubiquitination de PCNA dans la TLS.**

Pour cette étude, nous utilisons un test de réplcation d'ADN endommagé *in vitro*, dans lequel un ADN simple-brin portant une lésion unique est incubé en présence d'extraits de cellules humaines. Cette approche est complémentaire de celles utilisées par les autres équipes de recherche dans le domaine, qui effectuent des études biochimiques avec des protéines purifiées, ou bien qui utilisent des modèles cellulaires ou animaux. L'approche que nous avons choisie ne comporte pas d'« à priori » sur les facteurs mis en jeu, et présente l'avantage d'analyser spécifiquement les mécanismes de TLS, indépendamment des autres réponses cellulaires au stress (telles que la réparation ou la recombinaison).

Résultats et discussion

Ce chapitre "Résultats et discussion" est composé de deux grandes parties:

- **Régulation de la mono-ubiquitination de PCNA** dans laquelle nous avons analysé (1) la mono-ubiquitination de PCNA et (2) l'activation de Rad18 dans un extrait de cellules humaines compétent pour la réplication. Une partie des résultats obtenus en (1) a été publiée sous la forme d'un article dans *DNA Repair* ("Requirements for PCNA mono-ubiquitination in human cell-free extracts". Valérie Schmutz, Jérôme Wagner, Régine Janel-Blintz, Robert Fuchs et Agnès Cordonnier. *DNA Repair* (2007), volume 6, numéro 12, pages 1626 à 1731).

- **Rôle de la mono-ubiquitination de PCNA et étude de la contribution des différents domaines de Pol η lors du franchissement de deux lésions de l'ADN dans des extraits cellulaires humains.** Dans cette partie, nous avons étudié l'activité de Pol η dans la TLS de deux lésions différentes afin de vérifier si celle-ci est toujours couplée à la mono-ubiquitination de PCNA par Rad6/Rad18. Une partie des résultats a fait l'objet d'un article accepté dans *Nucleic Acids Research* ("Role of the ubiquitin-binding domain of Pole in Rad18-independent translesion DNA synthesis in human cell-free extract". Valérie Schmutz, Régine Janel-Bintz, Jérôme Wagner, Denis Biard, Naoko Shiomi, Robert P.P. Fuchs et Agnès M. Cordonnier).

Dans ce chapitre, nous avons tenu à vous présenter à la fois les données publiées sous forme résumée et non publiées et à les discuter ensemble de manière plus approfondie. Les deux articles sont présents en annexe.

Première partie:
Régulation de la mono-ubiquitination
de PCNA

1. Introduction

La protéine **PCNA** (Proliferating cell nuclear antigen), anneau de processivité des ADN polymérase répliquatives, joue le rôle de **plateforme d'interaction** pour de nombreuses protéines de la réplication de l'ADN, la réparation, la régulation du cycle cellulaire et l'assemblage de la chromatine. Chez *S. cerevisiae*, la mono-ubiquitination de PCNA au niveau de sa lysine K164 par le complexe Rad6/Rad18 a été identifiée comme un pré-requis pour la TLS et la mutagenèse induite par les dommages (Hoegge et al., 2002; Stelter and Ulrich, 2003). Selon différentes études, l'interaction entre PCNA ubiquitiné (Ub-PCNA) et les ADN polymérase translésionnelles permettrait l'échange entre les polymérase répliquatives et translésionnelles durant la synthèse translésionnelle (Kannouche et al., 2004; Watanabe et al., 2004; Bienko et al., 2005; Plosky et al., 2006; Guo et al., 2006).

Selon le modèle proposé dans la littérature, **le recrutement de Rad6/Rad18 aux fourches de réplication bloquées se fait grâce à une interaction physique entre RPA et Rad18 au niveau de l'ADN simple-brin généré par le découplage des activités de la polymérase répliquative et de l'hélicase** (Chang et al., 2006; Davies et al., 2008 ; Huttner et al., 2008). Des études menées *in vitro* montrent que la mono-ubiquitination de PCNA de levure par les protéines Rad6 et Rad18 purifiées ne requiert qu'un ADN simple-brin hybridé à un oligonucléotide, RPA et RFC (Garg et al., 2005; Haracska et al., 2006). Seules les molécules de PCNA chargées par RFC sur l'ADN au niveau de la jonction ADN double-brin/simple-brin sont mono-ubiquitinées.

Dans le but d'élucider le mécanisme d'activation de Rad18 dans un contexte de synthèse d'ADN, nous avons analysé la mono-ubiquitination de PCNA **dans un extrait de cellules humaines compétent pour la réplication**. Le substrat utilisé est un ADN simple-brin circulaire hybridé à une amorce radiomarkée. Dans un deuxième temps, nous avons cherché à savoir si la protéine Rad18 est la cible de phosphorylations en réponse à des dommages de l'ADN induits par les UV.

2. Mono-ubiquitination de PCNA dans les extraits de cellules humaines

A. Résultats

1. La mono-ubiquitination de PCNA dans les extraits de cellules humaines nécessite l'extension de l'amorce

Des extraits de cellules MRC5 (fibroblastes humains transformés par SV40) sont incubés à 37°C en présence d'ADN simple-brin circulaire dans un tampon réactionnel. L'analyse en Western Blot des protéines après 20 minutes d'incubation montre que PCNA est modifié pendant la réaction uniquement en présence d'ADN hybridé à une amorce et des dNTP. Cela suggère que **la synthèse de l'ADN est une étape obligatoire pour induire la modification** (Figure 43).

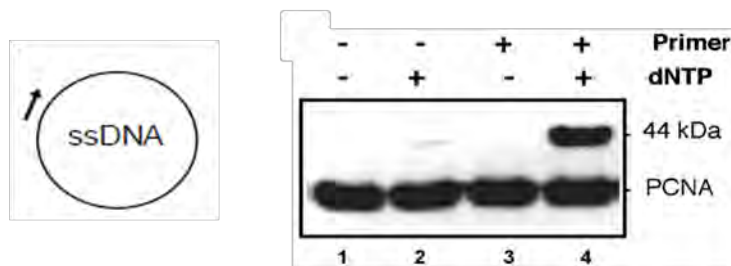


Figure 43 : La modification de PCNA requiert l'élongation de l'amorce dans les extraits cellulaires. Un extrait MRC5 est incubé pendant 20 minutes à 37°C en présence de 10fmol d'ADN simple-brin circulaire hybridé ou non à une amorce. Les quatre dNTP (200µM) sont inclus dans la réaction comme indiqué.

Les résultats obtenus en incubant un ADN simple circulaire avec (1) des extraits MRC5 transfectés avec un plasmide codant pour une his-ubiquitine (Figure 44) et (2) avec des extraits de cellules HeLA exprimant un mutant dominant-négatif de Rad18 (Rad18-C28F) ou de cellules HCT116 Rad18 KO (collaboration avec le Docteur Shiomi, Research center for charged particle therapy, Japon) démontrent que **la modification de PCNA observée est bien une mono-ubiquitination et qu'elle dépend de Rad18.**

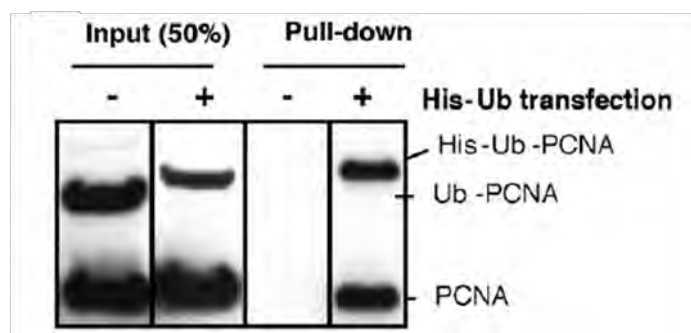


Figure 44: La modification de PCNA dans les extraits de cellules humaines est une mono-ubiquitination. Un extrait cellulaire MRC5 préparé 48H après transfection transitoire avec un vecteur exprimant His-ubiquitine (pMT107) est incubé 30 minutes à 37°C en présence de 100 fmol du substrat d'ADN. Les protéines de l'extrait cellulaire total (input) ou après purification sur billes de nickel (pull-down) sont analysées par Western Blot à l'aide d'un anticorps dirigé contre PCNA.

En accord avec les systèmes de mono-ubiquitination de PCNA *in vitro* avec des protéines purifiées (Garg et al., 2005; Haracska et al., 2006; Masuda et al., 2010), **seul le PCNA recruté au niveau de la jonction ADN double-brin/ADN simple-brin est mono-ubiquitiné** comme le montre l'analyse par Western Blot les protéines interagissant avec l'ADN (Figure 45). On observe également que toutes les molécules de PCNA capturées ne sont pas mono-ubiquitinées. Des monomères mono-ubiquitinés ou non pourraient donc coexister sur un même anneau.

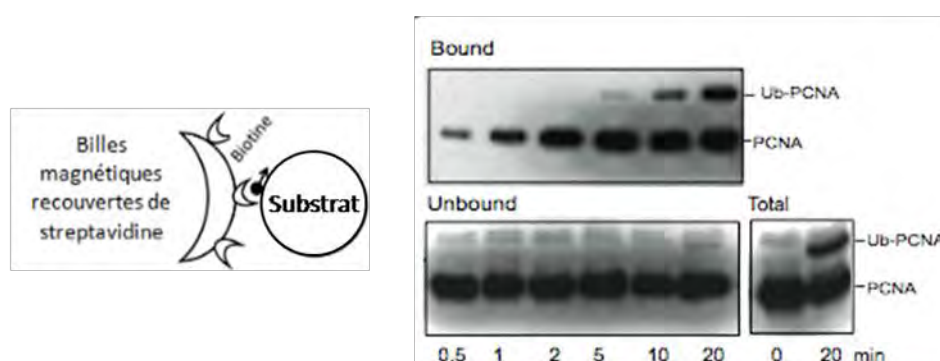


Figure 45 : PCNA est recruté au niveau de l'ADN simple-brin hybridé à une amorce et mono-ubiquitiné durant l'élongation de l'amorce. Pour isoler spécifiquement la protéine PCNA recrutée durant l'élongation de l'amorce, un ADN simple-brin circulaire est hybridé avec un oligonucléotide portant une biotine en 5' et immobilisé par la streptavidine recouvrant des billes magnétiques. Le substrat d'ADN immobilisé par les billes est ensuite incubé en présence d'un extrait cellulaire MRC5 à 37°C en présence des 4 dNTP. Aux temps indiqués, les billes sont séparées du surnageant (grâce à un aimant) et lavées trois fois avec un tampon Hepes (pH 7.9). Les protéines ont été analysées par Western Blot à l'aide d'un anticorps dirigé contre PCNA.

Il est intéressant de noter que des expériences de titration montrent que la quantité d'Ub-PCNA formé au cours de l'incubation est en large excès par rapport au nombre de jonction amorce-matrice d'ADN inclus dans la réaction. En effet, 60 fmol de monomères de PCNA sont ubiquitinés pour 10 fmol d'ADN (Figure 46). **Des cycles successifs de chargement et d'ubiquitination de PCNA ont donc lieu durant la réaction.** Le même résultat est obtenu avec un extrait de cellules XP30RO (fibroblastes d'un patient XP-V, transformé par SV40).

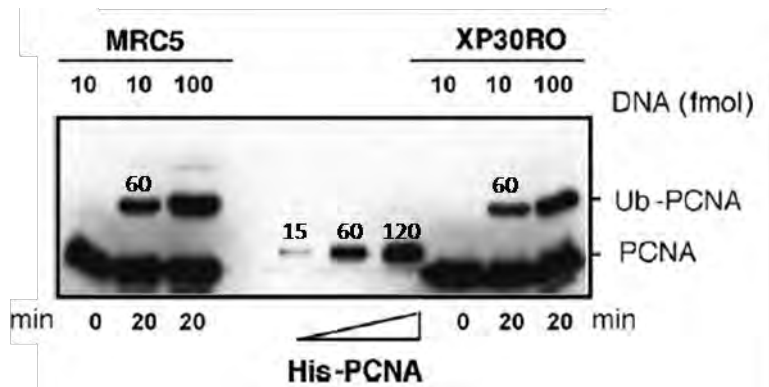


Figure 46: Plusieurs cycles de chargement et d'ubiquitination de PCNA ont lieu durant l'élongation de l'amorce dans les extraits cellulaires humains. Un extrait de cellules MRC5 ou XP30RO est incubé avec différentes concentrations d'ADN à 37°C en présence des 4 dNTP. 15, 60 et 120 fmol de His-PCNA sont déposés en parallèles pour détecter la quantité de PCNA mono-ubiquitiné dans les extraits au cours de la réaction.

Tous ces résultats montrent que **PCNA est mono-ubiquitiné dans les extraits cellulaires par Rad18 au cours de l'élongation de l'amorce**. L'ADN simple-brin *per se* n'est donc pas un signal suffisant pour activer Rad6/Rad18.

2. La mono-ubiquitination de PCNA est couplée aux pauses du complexe de réplication

Pour élucider les mécanismes impliqués dans la modification de PCNA, nous avons analysé en parallèle les produits d'extension d'une amorce radiomarquée hybridée à l'ADN simple-brin en présence d'un extrait cellulaire MRC5 et les modification de PCNA par Western Blot (Figure 47). Après migration sur gel dénaturant, nous avons ainsi observé des intermédiaires de réplication qui correspondent à des pauses transitoires de l'ADN polymérase au niveau de structures secondaires stables de l'ADN (de type épingle à cheveux). **L'apparition de Ub-PCNA est corrélée à la présence de ces pauses, ce qui suggère que l'arrêt d'un complexe de réplication est à l'origine de la modification de PCNA.** En effet, en présence de la protéine SSB (Single-strand DNA binding protein) d'*E. coli* qui permet d'éliminer partiellement ces structures secondaires, le taux d'Ub-PCNA est réduit (Figure 47).

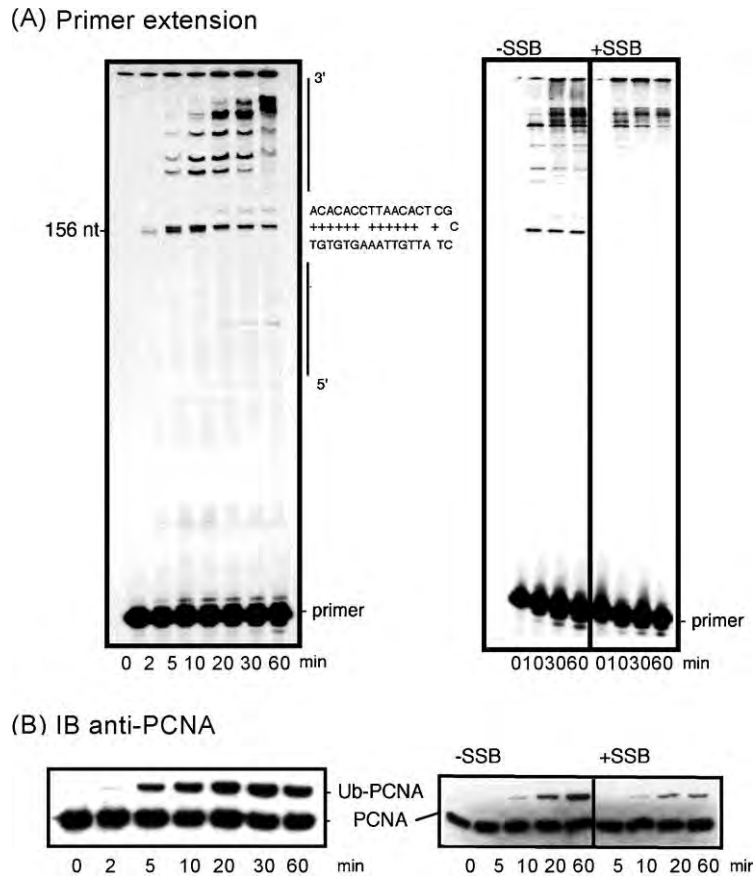


Figure 47 : La mono-ubiquitination de PCNA est couplée à une pause du complexe de réplication au niveau d'une structure secondaire de l'ADN en épingle à cheveux. Un extrait cellulaire MRC5 est incubé en présence d'ADN simple-brin hybridé à une amorce radiomarquée et en présence de 40 μ M de dNTP. Les produits sont analysés par électrophorèse en gel dénaturant (7% urée/8% polyacrylamide) (A) et par Western Blot (B) avec un anticorps anti-PCNA. Les réactions en présence de SSB ont été faites dans un ratio de 1 : 5 ADN/SSB (w/w).

Cette observation est en accord avec différentes études proposant que la modification de PCNA résulterait de l'arrêt spontané des fourches de réplication au niveau de sites de pause naturels. Ainsi, une fraction de PCNA est mono-ubiquitinée durant la phase S dans des cellules non endommagées de *S.pombe* (Frampton et al., 2006). La déplétion de la déubiquitinase USP1 dans les cellules de mammifères HEK293 ou les cellules de poulet DT40 révèle une mono-ubiquitination de PCNA en absence de dommages, ce qui impliquerait que **Rad6/Rad18 pourrait agir de manière constitutive** (Huang et al., 2006; Simpson et al., 2006).

Pour vérifier que la mono-ubiquitination de PCNA n'est pas induite en l'absence de sites de pause tels que les structures en épingle à cheveux ou des lésions de l'ADN, de nouveaux substrats d'ADN ont été élaborés: l'ADN simple-brin est hybridé à une amorce radio-marquée et à deux oligonucléotides situés de telle manière que la structure en épingle à cheveux ne puisse pas se former. **En absence de hairpin, nous avons ainsi pu vérifier que la mono-ubiquitination de PCNA n'est pas induite dans des extraits MRC5** (Figure 48A). **Par contre, la présence d'une lésion TT-CPD induit la modification de PCNA avec la**

même efficacité que la lésion G-AAF (N-2 acétylaminofluorène sur une guanine) (Figure 48B). Ces deux lésions bloquent efficacement la synthèse de l'ADN dans les extraits de cellules XP30RO issues d'un patient atteint de la forme variante de la maladie Xeroderma pigmentosum en raison de l'absence de la polymérase translésionnelle Pol η (Cordonnier et al. 1999).

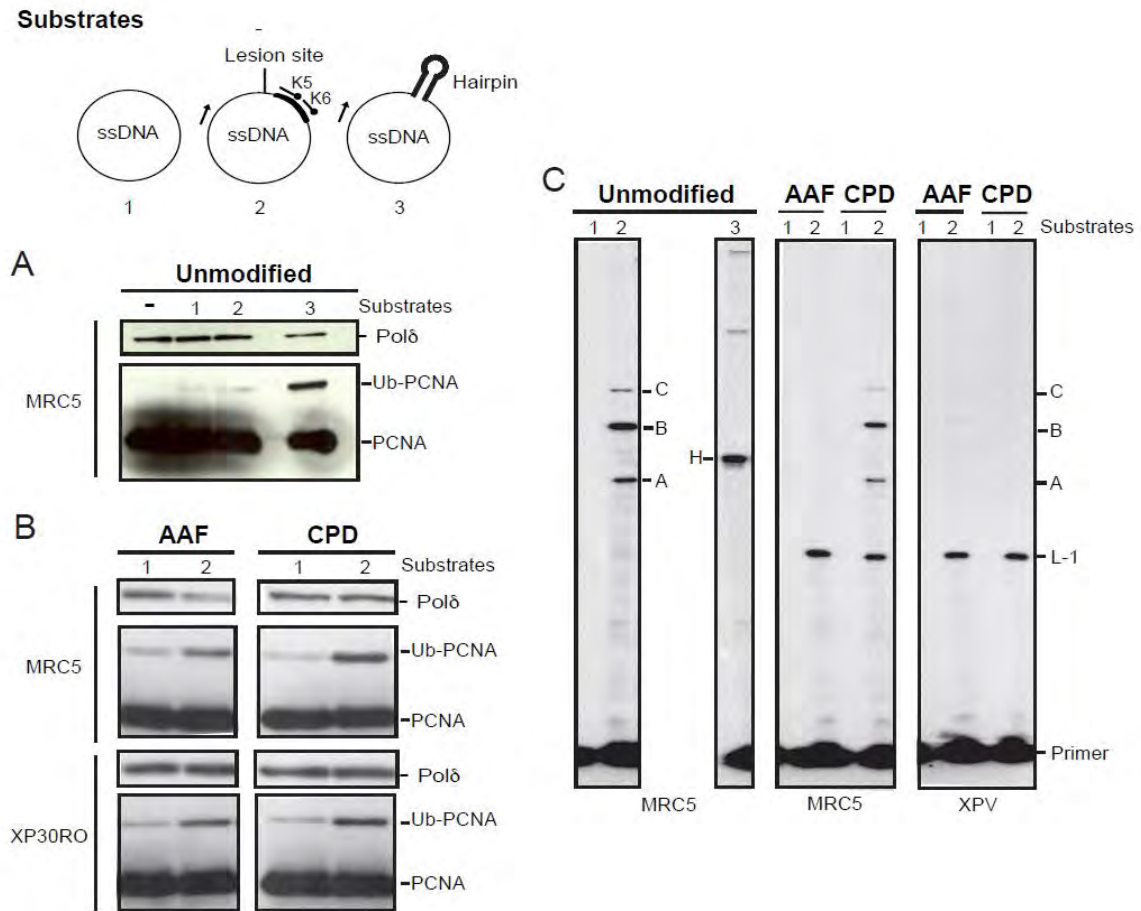


Figure 48: Les lésions CPD et AAF bloquent la réplication et induisent la mono-ubiquitination de PCNA. Pour délimiter une portion d'ADN sans site de pause, nous avons hybridé l'ADN simple-brin à deux oligonucléotides K5 et K6 (substrat 2) qui empêchent la formation de la première hairpin. Les deux oligonucléotides portent une biotine en 3', ce qui empêche leur élongation. Ce même substrat peut aussi porter une lésion unique CPD ou AAF, en amont de K5 et K6. Les substrats d'ADN sont incubés 10 minutes à 37°C avec les extraits cellulaires MRC5 ou XP30RO, en présence de streptavidine. La réaction a été analysée à la fois par Western Blot avec à des anticorps dirigés contre PCNA et Pol δ (A et B) et par électrophorèse en gel dénaturant (C). **A.** La mono-ubiquitination de PCNA est inefficace en absence du substrat (0), sans amorce (1) ou en présence de K5 et K6 (2). **B.** Une lésion CPD ou AAF stimule la modification de PCNA dans les deux extraits. **C.** Analyse de l'élongation de l'amorce, en gel d'acrylamide 6%, 7M d'urée. Avec K5 et K6, trois produits d'élongation sont visualisés: l'élongation s'arrête en 5' de K5 (produit A), une ligation entre A et K5 a lieu (produit B) et B se ligue avec K6 (produit C). Sans K5/K6, l'arrêt au niveau de la hairpin peut être visualisé (H). Enfin, les lésions CPD et AAF causent un arrêt de la synthèse d'ADN un nucléotide avant la lésion (L-1).

3. Le taux de mono-ubiquitination de PCNA augmente avec la taille des fragments d'ADN synthétisés par un complexe de réplication processif

Nous avons aussi étudié l'effet de l'aphidicoline, inhibiteur des ADN polymérase eucaryotes, sur la modification de PCNA (Figure 49).

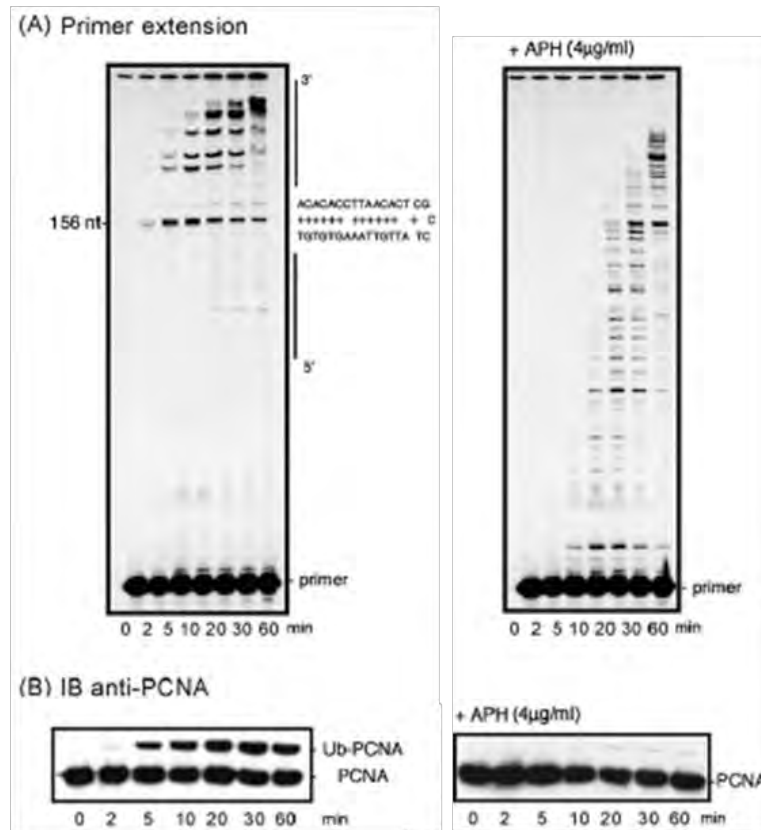


Figure 49 : Effet de l'aphidicoline sur la mono-ubiquitination de PCNA. L'extrait cellulaire MRC5 est incubé en présence de 4µg/ml d'aphidicoline avec 10 fmol d'ADN simple-brin hybridée à une amorce radiomarquée. Une analyse des produits d'élongation de l'amorce est faite par électrophorèse en gel dénaturant (7% urée/ 8% polyacrylamide) (A). La modification de PCNA est révélée grâce à un anticorps anti PCNA par Western Blot (B).

La drogue ajoutée dans le tampon de réplication en même temps que l'extrait cellulaire inhibe la synthèse de l'ADN dès le démarrage de la réaction d'élongation. En présence d'aphidicoline, la synthèse d'ADN se fait de manière distributive avec de nombreux arrêts, visualisés sur gel par la présence de nombreuses bandes. Dans ces conditions, la mono-ubiquitination de PCNA est réduite de manière dramatique. L'augmentation de la concentration de dNTP supprime partiellement l'effet inhibiteur de l'aphidicoline sur la modification de PCNA (données non présentées). La drogue n'a donc pas d'effet direct sur la modification de PCNA mais plutôt à travers l'altération du complexe de réplication. Ces données suggèrent que **la mono-ubiquitination de PCNA dans les extraits cellulaires nécessite l'arrêt d'un complexe de réplication actif et processif.**

Pour déterminer de quelle manière la synthèse de l'ADN pourrait influencer l'efficacité de la réaction, nous avons utilisé différentes combinaisons de dNTP permettant la synthèse de fragments d'ADN de taille définie (Figure 50).

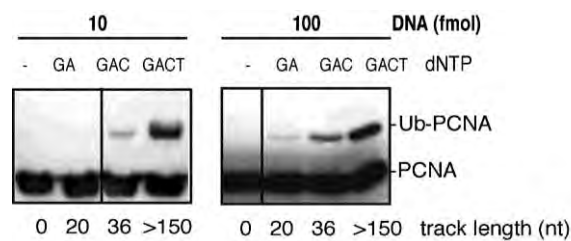


Figure 50 : Le taux de modification de PCNA dépend de la longueur des brins d'ADN synthétisés. Un extrait cellulaire MRC5 est incubé en présence d'un ADN simple-brin hybridé à une amorce pendant 20 minutes à 37°C, en absence ou en présence des combinaisons de dNTP indiquées.

Ainsi, en présence de la combinaison GA qui permet la synthèse d'un fragment d'ADN de vingt nucléotides, la quantité de Ub-PCNA produite est plus faible qu'en présence de la combinaison GAC qui permet une synthèse de trente-six nucléotides ou des quatre nucléotides GACT qui entraîne la synthèse d'un fragment de taille supérieure à 150 nucléotides. **L'efficacité de modification de PCNA est donc corrélée avec la longueur de des fragments d'ADN synthétisés**, indiquant qu'un **complexe de réplication mature pourrait être requis pour induire la mono-ubiquitination de PCNA au niveau d'un site de pause.**

Nous avons voulu vérifier ce résultat à l'aide d'un substrat d'ADN qui porte une lésion AAF. Cette lésion bloque la synthèse d'ADN catalysée par un extrait de cellules XP30RO (cellules XP-V dépourvues de Polε). L'ADN simple-brin mono-modifié est hybridé à différentes amorces situées à 7, 20, 38 ou 68 nucléotides de l'adduit (Figure 51). La mono-ubiquitination de PCNA est plus efficace lorsque l'amorce est la plus éloignée de l'adduit AAF, c'est-à-dire à 68 nucléotides.

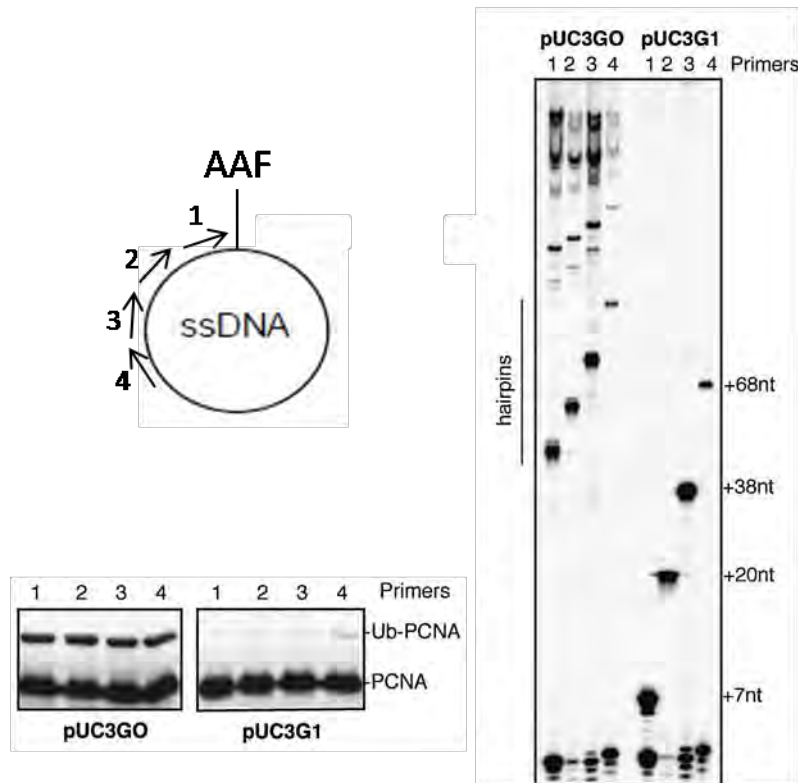


Figure 51: La mono-ubiquitination de PCNA requiert la synthèse d'un fragment d'ADN d'au moins quarante nucléotides. Un extrait cellulaire XP30RO est incubé en présence de 10 fmol d'un ADN simple-brin pUC3GO ou pUC3G1 (portant une lésion unique G-AAF) 10 minutes à 37°C. L'efficacité de la mono-ubiquitination de PCNA (Western Blot à gauche) et de l'élongation (gel dénaturant à droite) en absence ou en présence de la lésion est analysé en testant quatre amorces différentes, localisées à 7, 20, 38 et 68 nucléotides de la lésion AAF.

Il est important de noter que la mono-ubiquitination de PCNA est moins efficace avec un ADN mono-modifié qu'avec un ADN non modifié, ce qui peut sembler paradoxal par rapport à la situation *in vivo* où la mono-ubiquitination de PCNA n'est observée qu'après traitement des cellules avec un agent endommageant l'ADN. En absence de lésions, plusieurs sites de pauses dus à différentes hairpins sont visibles sur gel. Au vu de nos résultats, nous pouvons émettre l'hypothèse que **chaque site de pause induit la modification de PCNA**, menant à la visualisation par Western Blot de forts taux d'Ub-PCNA. En présence d'un **seul site de pause**, au niveau de la guanine modifiée, il n'y a qu'un **seul obstacle pour la synthèse d'ADN et un seul signal pour la mono-ubiquitination**. L'accumulation d'Ub-PCNA résulte sans doute de multiples cycles d'ubiquitination lors du chargement de PCNA à chaque site de hairpin.

B. Conclusion

Les résultats présentés ci-dessus indiquent que **la mono-ubiquitination de PCNA a lieu quand la synthèse de l'ADN est bloquée au niveau de sites de pause, mais seulement lorsque la synthèse a permis la polymérisation de fragments d'ADN d'une certaine longueur**. Au vu de l'influence de la longueur des fragments d'ADN synthétisés au cours de nos essais, une conformation mature du complexe de réplication pourrait être nécessaire pour la mono-ubiquitination de PCNA après l'arrêt du complexe en raison de l'absence d'un nucléotide (combinaison GAC), de la présence d'une lésion (G-AAF ou TT-CPD) ou d'une structure secondaire de l'ADN.

Le besoin d'une synthèse d'ADN dans notre système pourrait simplement refléter la nécessité d'un complexe de réplication actif dans lequel PCNA chargé par RFC sur l'ADN est stable. Masuda et al ont montré en effet que, dans un système *in vitro* avec des protéines purifiées (RFC, PCNA, RPA, E1, Rad6, Rad18, ubiquitine et Pol δ), la mono-ubiquitination de PCNA chargé sur l'ADN simple-brin est plus efficace en présence de Pol δ ou de RFC. Les auteurs ont également observé le chargement successif de 4 à 5 trimères de PCNA par molécule d'ADN au cours de la synthèse d'ADN, ce qui expliquerait l'effet stimulateur de celle-ci sur la mono-ubiquitination de PCNA. Le substrat utilisé dans cette étude est un ADN simple brin circulaire (M13) et le rôle éventuel de structures secondaires présentes sur la matrice d'ADN sur le chargement multiple de PCNA n'a pas été analysé. De plus, les facteurs qui pourraient être impliqués dans l'activation de Rad6/Rad18 lors du blocage de la synthèse d'ADN sont absents (Masuda et al., 2010). En effet, une publication rapporte que **des membres actifs du checkpoint de la réplication seraient impliqués dans la mono-ubiquitination de PCNA** (Yang et al., 2008; Yang and Zou, 2009). Ainsi, **Chk1**, indépendamment de sa fonction kinase, renforcerait la mono-ubiquitination de PCNA en réponse aux UV ou à l'hydroxy-urée en stabilisant la protéine du réplisome **Claspine**, sans laquelle la présence de Rad18 sur la chromatine est diminuée (Yang et al., 2008). La claspine a été originellement décrite comme protéine essentielle de la phosphorylation et de l'activation de Chk1 par ATR en réponse à un stress de réplication dans des extraits d'œufs de Xénope (Kumagai and Dunphy, 2000). Cependant, différentes études chez *S. cerevisiae* et dans les cellules humaines ont montré que cette protéine, indépendamment de son rôle dans le checkpoint, est requise pour la progression normale des fourches de réplication (Katou et al., 2003; Szyjka et al., 2005; Tourriere et al., 2005; Petermann et al., 2008; Scorah and McGowan, 2009). Chez la levure, son homologue Mrc1 interagit physiquement avec la sous-

unité catalytique de l'ADN polymérase ϵ et avec le complexe MCM (Lou et al., 2008 Cell). Mrc1 maintiendrait alors la stabilité des fourches de réplication en couplant les activités de la polymérase et de l'hélicase (Katou et al., 2003; Lou et al., 2008). Le mécanisme par lequel la claspine régulerait la mono-ubiquitination de PCNA est peu clair. D'une part, la déplétion de la Claspine réduit le taux de Rad18 dans la chromatine. D'autre part, la déplétion de **Timeless**, une protéine interagissant avec la claspine, résulte aussi en une baisse de l'ubiquitination de PCNA. Enfin, Chk1, Claspine et Timeless interagissent avec PCNA dans les cellules humaines (Yang et al., 2008; Scora et al., 2008). De plus, Tipine, protéine associée à Timeless, interagit avec RPA (Gotter et al., 2007; Unsal-Kacmaz et al., 2007). Toutes ces protéines pourraient constituer un module fonctionnel au niveau de la fourche de réplication et, à travers leurs interactions avec RPA et avec PCNA, joueraient un rôle dans la mono-ubiquitination indépendamment de leur implication dans le checkpoint de la réplication (Yang et al., 2008; Yang and Zou, 2009) (Figure 52). Il est à noter que chez *S. cerevisiae*, la déplétion de Mrc1 n'abolit pas la modification de PCNA (Davies and Ullrich, données non publiées, dans Ulrich, 2009).

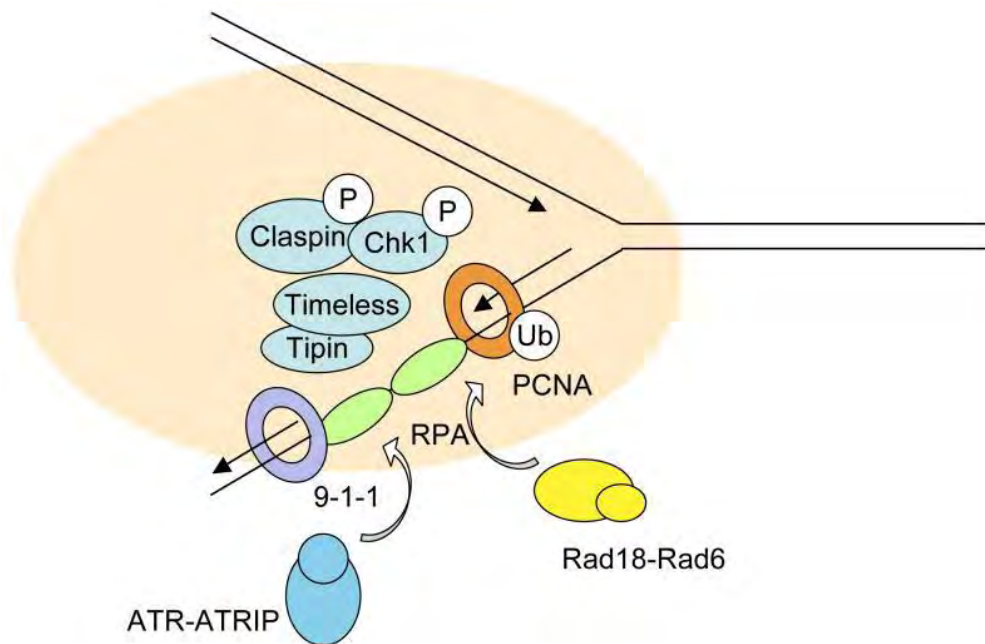


Figure 52: Représentation schématique des protéines impliquées dans la mono-ubiquitination de PCNA au niveau d'une fourche de réplication de l'ADN. Chk1, Claspine, Timeless et Tipine constituent un complexe fonctionnel au niveau des fourches de réplication. A travers leurs interactions avec RPA, 9-1-1 et PCNA, ce complexe serait impliqué à la fois dans l'activation du checkpoint et dans la mono-ubiquitination de PCNA par Rad6/Rad18. Adapté de Yang et Zou, 2009.

C. Perspectives

L'essai de synthèse translésionnelle *in vitro* dans des extraits de cellules humaines peut être utile pour analyser les composants du réplisome lors de son assemblage, du blocage aux sites de pauses et l'activation de Rad6/Rad18.

Dans cette optique, l'ADN simple-brin est hybridé un oligonucléotide amorce couplée à une biotine. Le substrat immobilisé sur des billes magnétiques couvertes de streptavidine est incubé avec l'extrait cellulaire choisi. Au cours d'une cinétique de réplication, les protéines interagissant avec le substrat sont capturées sur les billes. Après des lavages successifs, les protéines sont séparées au cours d'une électrophorèse en deux dimensions (Figure 53). Les protéines capturées sont identifiées par spectrométrie de masse ou par Western Blot avec des anticorps spécifiques. Ainsi, nous pourrions détecter à partir d'extraits cellulaires exprimant HA-Rad18 d'éventuelles modifications de Rad18 (par Western-blot avec des anticorps dirigés contre l'étiquette HA), de Rad6 ou des différentes sous-unités de RPA, qui accompagneraient le déclenchement de la mono-ubiquitination de PCNA. Nous envisageons également d'analyser les autres constituants du réplisome qui contribuent à la stabilité du complexe tels que Chk1, Claspin et Tipin.

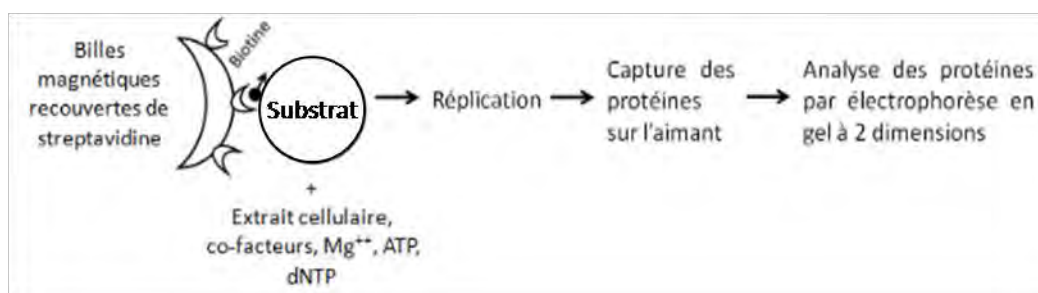


Figure 53: Représentation schématique de l'essai à refaire en ajoutant élution des protéines.

Nous avons montré que la mono-ubiquitination de PCNA nécessite un complexe de réplication mature et l'arrêt de la polymérase à des sites de modification de l'ADN. Nous proposons que le complexe de réplication pourrait être modifié lors du blocage et que ce changement représenterait le signal moléculaire qui induirait la cascade d'évènements menant finalement à la modification de PCNA par Rad18. Nous désirons donc **identifier les composants d'un complexe de réplication mature et détecter les modifications des composants de ce réplisome lorsqu'il rencontre une lésion.**

Différentes conditions expérimentales sont envisagées pour identifier les protéines impliquées dans (1) l'assemblage du réplisome, (2) la processivité du réplisome et (3) le blocage du réplisome (Figure 54). Pour simplifier l'analyse et éliminer les signaux dus aux

conséquences de l'activation de Rad18, nous pourrions utiliser des lignées cellulaires déficientes pour Rad18, notamment des HCT116 Rad18^{KO} (collaboration avec Shiomi, Research center for charged particle therapy, Japon) et MRC5 Rad18^{KD} (collaboration Denis Biard).

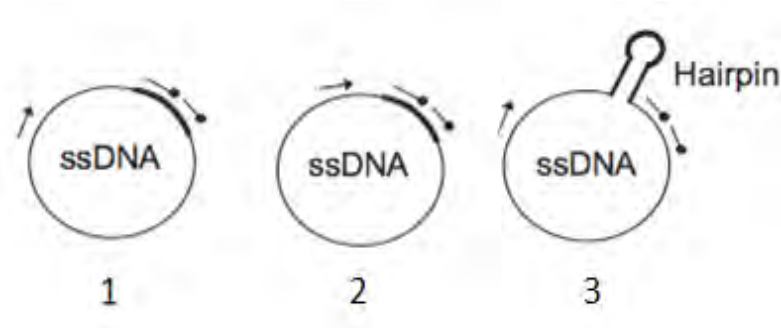


Figure 54: Substrats d'ADN. Les différents substrats d'ADN utilisés dans le projet sont visualisés. L'ADN simple-brin est hybridé à une amorce et des oligonucléotides portant une biotine en 3' qui délimitent la zone de synthèse de l'ADN: 1. synthèse de plus de 40 nucléotides sans dommages; 2. synthèse de moins de 40 nucléotides, sans dommage; 3. synthèse de plus de 40 nucléotides en présence d'une hairpin unique.

(1) Nous avons montré qu'une synthèse d'ADN d'un minimum de quarante nucléotides est requise pour que le complexe de réplication soit compétent pour l'activation de Rad18. Cela reflète peut-être l'assemblage dynamique des sous-unités du complexe de réplication de l'ADN, dont la composition pourrait évoluer entre l'étape initiale et les étapes plus tardives de l'élongation. Pour identifier les composants d'un complexe de réplication mature, nous pourrions **comparer les cartes protéomiques obtenues lors d'une synthèse d'ADN de moins de quarante nucléotides et de plus de quarante nucléotides** (Figure 54, substrats 1 et 2), **en l'absence de hairpin**. En comparant la composition des complexes de réplication impliqués, nous pourrions aussi révéler les facteurs essentiels pour l'activation de Rad18.

(2) En présence d'aphidicoline, malgré de fréquents arrêts de l'élongation d'une amorce hybridée à un ADN simple-brin dans des extraits de cellules normales, la mono-ubiquitination de PCNA n'est pas observée. Pour identifier les composants d'un complexe de réplication processif compétent pour l'activation de Rad18, nous pourrions **comparer les cartes protéomiques obtenues pendant la réaction d'élongation en utilisant un substrat d'ADN simple-brin non modifié en présence ou en absence d'aphidicoline** (Figure 54, substrats 1 et 2).

(3) Enfin, nous pourrions établir **la carte protéomique d'une réaction d'élongation en présence d'une hairpin** (Figure 54, substrat 3), la synthèse étant assez longue pour permettre la modification de PCNA en réponse à l'arrêt du complexe de réplication au niveau de cette structure.

La compilation et l'analyse de ces différentes cartes protéomiques nous permettront d'identifier les facteurs impliqués dans l'activation de Rad18. Il pourrait, cependant, être difficile de comparer la position d'une protéine sur des gels différents. L'utilisation de la technique d'électrophorèse 2D-DIGE (2-Dimensionnal Differential in-Gel Electrophoresis), technique fiable de protéomique comparative sur gel, est envisagée.

Lors d'une première expérience, un extrait MRC5 a été incubé en présence du substrat d'ADN couplé aux billes magnétiques ou en présence des billes seules. Après la migration des protéines capturées par électrophorèse en deux dimensions, les gels ont été colorés au nitrate d'argent (Figure 55). Cette coloration permet de détecter des spots contenant au minimum environ 0,1 ng de protéines. Elle présente néanmoins certains inconvénients: la stœchiométrie de la coloration n'est pas totalement linéaire et certaines protéines sont peu ou pas colorées par cette méthode. Nous avons dénombré 85 spots dont 25 représentant des protéines interagissant avec les billes de manière aspécifique. **56 spots correspondent donc à des protéines interagissant avec l'ADN au cours de l'incubation** (Figure 55).

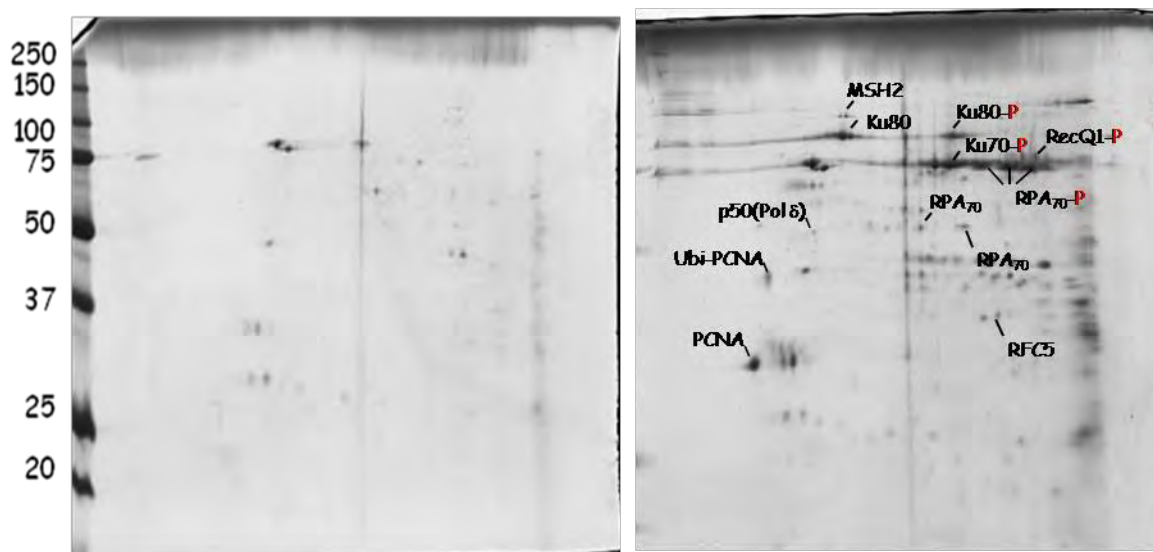


Figure 55: Coloration au nitrate d'argent des protéines capturées et identification par spectrométrie de masse. Un extrait MRC5 (3 mg) a été incubé 20 min à 37°C en absence (à gauche) ou en présence d'un ADN simple-brin (5 µg) hybridé à une amorce portant une biotine en 5' et hybridé avec 625 µg de billes de streptavidine (à droite). Les protéines capturées sont précipitées au TCA et la quantité dosée par Bradford: sans ADN, 1,5 µg; avec ADN, 6 µg. Les protéines resuspendues dans le tampon IEF sont déposées sur une bandelette de gradient de pH3 à 10 (de gauche à droite) pour la première dimension. Après migration dans la deuxième dimension, les gels sont colorés au nitrate d'argent. 25 et 85 spots sont alors apparus. PCNA et sa forme mono-ubiquitinée, la sous-unité p50 de Polδ, différentes formes de RPA70, RFC5, les protéines Ku70 et Ku80, MSH2 et l'hélicase RECQL1 ont été identifiés par spectrométrie de masse. Les protéines indiquées avec P sont phosphorylées.

L'analyse par spectrométrie de masse de ces 56 spots a permis l'identification de:

- **PCNA et de sa forme mono-ubiquitinée,**

- la sous-unité **p50** de Polδ. Cette sous-unité est une plate-forme pour l'assemblage de Polδ en interagissant avec les trois autres sous-unités p125, p66 et p12 et interagit avec des protéines régulant le métabolisme de l'ADN comme PCNA (Lu et al., 2002), p21 (Li et al., 2006),

PDIP1 (polymerase delta-interacting protein 1) (He et al., 2001) et l'hélicase WRN (Szekely et al., 2000),

- **RPA70**, l'une des trois sous-unités de RPA. RPA (protein replication A) est une protéine se liant à l'ADN simple-brin avec une grande affinité, interagissant avec de multiples protéines requises pour le métabolisme de l'ADN (revues: Wold, 1997; Ifthode et al., 1999;). RPA est composée de trois sous-unités de 70, 32 et 14 kDa (RPA70, RPA32 et RPA14 respectivement). RPA70 est composée de quatre domaines dont DBD F (DNA-binding domain F) qui est impliqué dans l'interaction avec les protéines (DBD F pour DNA-binding domain F) (Wold et al., 1997), et DBD A et B qui constituent les deux principaux domaines impliqués dans la liaison avec l'ADN simple-brin (Arunkumar et al., 2003; Wyka et al., 2003).

- **Ku70** et **Ku80** sont impliquées dans le mécanisme de recombinaison non homologue (NHEJ), la maintenance des télomères, la régulation de la transcription de certains gènes (par exemple, régulation du gène HSP (heat shock proteins)) (revue: Gullo et al., 2006).

- **RFC5** l'une des sous-unités de RFC (replication factor C) qui charge PCNA sur l'ADN. Cette sous-unité interagit avec PCNA (Cai et al., 1997; Mossi et al., 1997; Ohta et al., 2002).

- la protéine **MSH2** est un composant du mécanisme de réparation des mésappariements. Un défaut dans le gène *MSH2* est à l'origine du cancer HNPCC1 (hereditary non-polyposis colorectal cancer type 1) (Leach et al., 1993). La présence de structures en épingle à cheveux dans le substrat et donc de mésappariements explique sa capture. Il est à noter que cette protéine interagit avec Pole (test ELISA; pull-down; co-immunoprécipitation à partir d'extraits de cellules HeLa). Le complexe MSH2/MSH6 stimule l'activité de Pole *in vitro* (Wilson et al., 2005). MSH2 interagit aussi avec PCNA (Gu et al., 1998).

- **l'hélicase RecQ1** (DNA helicase Q1-like), membre de la famille des hélicases RecQ. Chez l'homme, on trouve 5 membres de cette famille: BLM, muté dans le syndrome de Bloom (Ellis et al., 1995); WRN, muté dans le syndrome de Werner (WS; Yu et al., 1996); RecQ4, muté dans les syndromes de Rothmund-Thomson (Kitao et al., 1999), de RAPADILINO (Siitonen et al., 2003) et de Baller-Gerold (Van Maldergem et al., 2006) syndromes; RecQ1 et RecQ5. Les rôles de RecQ1 sont peu connus: elle pourrait être impliquée dans le mécanisme de réparation des mésappariements et de recombinaison. En effet, elle interagit avec l'exonucléase 1 (*in vivo* et *in vitro*) et stimule son activité d'excision *in vitro*. Elle interagit aussi avec MLH1, **MSH2** et MSH6. Le complexe MSH2/6 stimule son activité d'hélicase (Doherty et al., 2005; Surtees et al., 2004). Enfin, la déplétion de cette protéine entraîne une réduction de la prolifération des cellules HeLa, une sensibilité aux radiations ionisantes ou à

la camptothécine et une augmentation des échanges de chromatides sœurs que les cellules soient traitées ou non à la camptothécine (Sharma et al., 2007).

Il est à noter que la coloration des gels au ProQ-diamond, qui colore spécifiquement les protéines phosphorylées, a montré que certaines protéines sont phosphorylées, comme RPA70 (Nuss et al., 2005), RecQ1 en réponse à une irradiation ionisante (Sharma and Brosh, 2007), et K70 et Ku80 par DNA-PK (Chan et al., 1999).

Cette expérience préliminaire nous a permis de capturer et d'identifier des protéines du réplisome. Ce premier résultat est encourageant et valide notre approche expérimentale. La réalisation de ce projet pourra contribuer à préciser le signal moléculaire qui conduit à l'activation de Rad6/Rad18 et à la mono-ubiquitination de PCNA.

3. L'activation de Rad18

Dans un deuxième temps, nous nous sommes intéressés à la protéine Rad18 et à sa dynamique en réponse aux agents qui bloquent la réplication.

A. Données bibliographiques sur Rad18

1. Les domaines de Rad18

Rad18, protéine de 495 acides aminés, possède plusieurs domaines nécessaires pour son activité et ses interactions avec d'autres protéines (Figure 56):

- Un **domaine RING** (Really Interesting New Gene) est situé en N terminal et est commun à toutes les E3 pour **l'interaction avec les enzymes E2**. Dans le cas de Rad18 chez la souris, il a été montré que Rad6 interagit avec le domaine RING de Rad18 et que la mutation C28F dans cette région entraîne une augmentation de la sensibilité à divers agents endommageant l'ADN (Tateishi et al., 2000).
- Un **domaine de liaison à Rad51** est situé dans le domaine RING. Les résidus C28, C5 et C46, nécessaires pour l'activité de ligase, ne sont pas requis pour cette interaction, indiquant que l'activité enzymatique de Rad18 n'est pas requise (Huang et al., 2009). Cette interaction est requise pour la fonction de Rad51 dans la recombinaison homologue (Huang et al., 2009).
- Un **domaine de liaison à RPA** est aussi situé en N-terminal (acides aminés 1 à 192 chez *S. cerevisiae*) (Davies et al., 2008). Chez *S. cerevisiae*, Rad18 interagit avec Rfa1 (acides aminés 167 à 452) et Rfa2 (acides aminés 182 à 421). Chez l'homme, Rad18 interagit aussi avec RPA (Davies et al., 2008).
- Une **seconde région en C-terminal** est aussi impliquée dans la **liaison avec Rad6** (Bailly et al., 1997 ; Ulrich and Jentsch, 2000). La délétion du peptide 340-395 entraîne la perte de l'interaction avec Rad6 *in vitro*, bien que la localisation aux dommages ne soit pas affectée (Watanabe et al., 2004), ce qui indique que l'interaction avec Rad6 n'est pas nécessaire pour la localisation de Rad18 aux dommages de l'ADN.
- Il a tout d'abord été proposé que le **Doigt de zinc** C₂H₂ (résidus 201-225 chez l'homme) était nécessaire pour la liaison à l'ADN (Jones et al., 1988; Bailly et al., 1994). Une étude récente a cependant montré que ce domaine ne reconnaît pas l'ADN *in vitro* mais se lie à l'ubiquitine (Notenboom et al., 2007) et à des chaînes d'ubiquitine de types K63 et K48 *in vitro* (Huang et al., 2009). De plus, une séquence qui contient ce domaine, entre les résidus 83 et 248, est

requis pour la **dimérisation** (études de double hybride chez la levure et chez les mammifères) (Ulrich and Jentsch, 2000 ; Tateishi et al., 2000 ; Miyase et al., 2005). Rad6 et Rad18 formeraient un **dimère d'hétérodimères** *in vitro* (Notenbomm et al., 2007). Enfin, ce domaine est nécessaire et suffisant pour la localisation de Rad18 aux sites de cassures double-brin (interaction avec l'ubiquitine de protéines poly-ubiquitinées; interaction avec 53BP1) et la délétion de ce domaine n'a pas d'impact sur la survie des cellules aux UV (Huang et al., 2009; Watanabe et al., 2009).

- Le **Domaine SAP** (résidus 243-282 chez l'homme) (pour SAF-A/B, Acinus and Pias) (Aravind and Koonin, 2000) est nécessaire pour la **localisation aux foyers contenant Polη** (Nakajima et al., 2006; Tsuji et al., 2008), **pour la liaison à l'ADN** (Notenbomm et al 2007; Tsuji et al 2008) et **pour l'activité de Rad18** car elle permet l'interaction avec PCNA *in vitro* et *in vivo* (Tsuji et al., 2008).

- Les acides aminés 401 à 445 forment un **domaine de liaison à Polη** (Watanabe et al., 2004).

- Enfin, les acides aminés **13 à 366** sont nécessaires pour la **liaison à PCNA** détectée par gel filtration (Notenboom et al., 2007). Aucune immuno-précipitation de Rad18 et PCNA n'est détectée dans les extraits cellulaires, ce qui semble indiquer que l'interaction entre les deux protéines est transitoire *in vivo* (Watanabe et al., 2004).

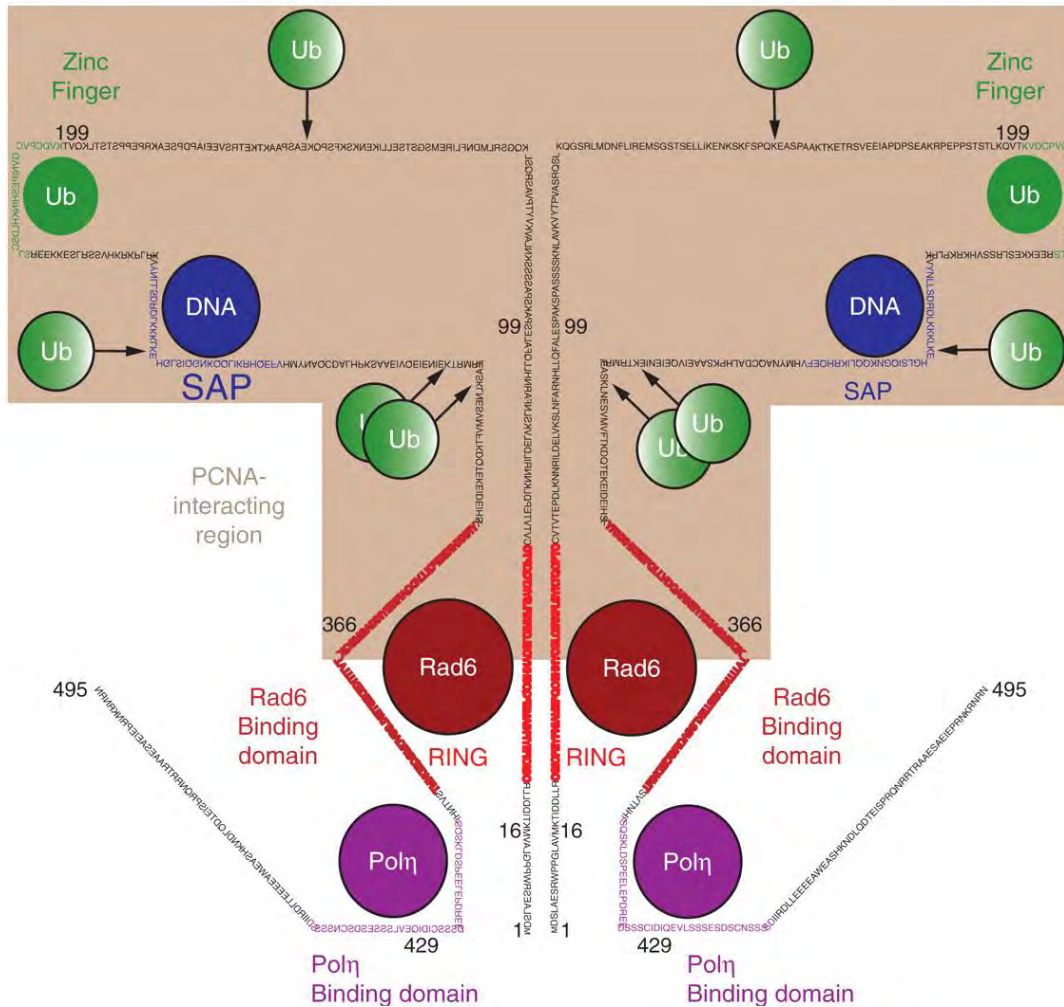


Figure 56: Représentation schématique de Rad18, de ses domaines d'interaction. Rad18 est une protéine de 495 acides aminés, qui forme avec Rad6 un hétérodimère. In vitro, les deux protéines sont sous forme de dimère d'hétérodimères comme présenté ici (Notenbomm et al., 2007). Le doigt de zinc permet la liaison avec l'ubiquitine (Ub en vert) (Huang et al., 2009; Notenboom et al., 2007) et est important pour la dimérisation (Ulrich and Jentsch, 2000 ; Tateishi et al., 2000 ; Miyase et al., 2005) et la localisation de Rad18 aux sites de cassures double-brin de l'ADN. Le domaine SAP permet la liaison à l'ADN (Notenboom et al., 2007) (en bleu) et est nécessaire pour l'activité de Rad18 (Tsuji et al., 2008) et la localisation de Polη aux dommages de l'ADN (Nakajima et al., 2006). Rad6 (en rouge) interagit avec le domaine RING (Tateishi et al., 2000) et le domaine de liaison entre les résidus 340 et 395 (Rad6 Binding Domain) (Ulrich and Jentsch, 2000 ; Bailly et al., 1997). Les résidus 401 à 445 concernent la liaison avec Polη (en violet) (Watanabe et al., 2004). En grisé, les acides aminés 13 à 366 sont nécessaires pour la liaison avec PCNA (Notenboom et al., 2007; Watanabe et al., 2004). Quatre lysines peuvent être ubiquitinées chez Rad18 de souris et sont indiquées par des flèches accompagnées d'une molécule d'ubiquitine. Issu de Notenboom et al., 2007.

2. Les rôles de Rad18

L'étude du rôle des différents domaines de Rad18 en réponse à des dommages de l'ADN a montré que Rad18 est impliquée dans deux voies distinctes, la **réparation des cassures double-brin de l'ADN** par la **recombinaison homologue** (Szuts et al., 2006; Huang et al., 2009) et **non homologue** (Watanabe et al., 2009) et la **synthèse translésionnelle**.

En réponse à des radiations ionisantes ou à un traitement à la camptothécine qui provoquent des cassures double-brin de l'ADN, Rad18 **localise aux sites de cassures** grâce à son **domaine Zinc Finger**.

En G1, Rad18 localise aux sites de cassures (foyers IRIFs ou IR-induced nuclear foci, où co-localisent BRCA1, MRE11/NBS1/RAD50 et 53BP1)(Paull et al., 2000; Schultz et al., 2000) grâce à son **association avec la protéine 53BP1 (p53-binding protein 1)** par l'intermédiaire de son doigt de zinc. 53BP1 est une protéine impliquée dans la réponse cellulaire aux cassures double-brin de l'ADN (revue: Adams and Carpenter, 2006). De plus, **Rad18 jouerait un rôle dans le maintien de 53BP1** dans les foyers IRIFs grâce à son **activité d'ubiquitine ligase**, permettant ainsi à la recombinaison non-homologue d'avoir lieu (Watanabe et al., 2009) (Figure 57).

En phase S et en phase G2, la localisation de Rad18 requiert **l'activité du complexe UBC13/RNF8** (E2 et E3) qui génère des chaînes de poly-ubiquitine nécessaires pour le recrutement de protéines liant l'ubiquitine aux sites de dommages de l'ADN (Kim et al., 2007; Sobhian et al., 2007; Wang et al., 2007; Petrini, 2007). Le domaine Zinc Finger pouvant se lier à l'ubiquitine *in vitro*, Huang et ses collaborateurs ont alors proposé que Rad18 serait recrutée par des protéines poly-ubiquitinées par UBC13/RNF8. La nature de ces protéines est inconnue. Suite à son recrutement, Rad18 serait impliquée dans le contrôle de la recombinaison homologue en interagissant directement avec **Rad51** grâce à son **domaine RING**, indépendamment de son activité de ligase. En effet, un mutant RAD51C-D1 qui ne peut plus interagir avec Rad18 ne peut complémenter la sensibilité aux radiations ionisantes ou à un traitement à la camptothécine de cellules déficientes pour Rad51 (Huang et al., 2009) (Figure 57).

En réponse aux UV, la mono-ubiquitination de PCNA nécessite d'autres domaines de Rad18: en particulier le **domaine d'interaction à PCNA**, le **domaine SAP** pour la liaison à l'ADN et à PCNA et le **domaine RING et son activité d'ubiquitine ligase** (Figure 57).

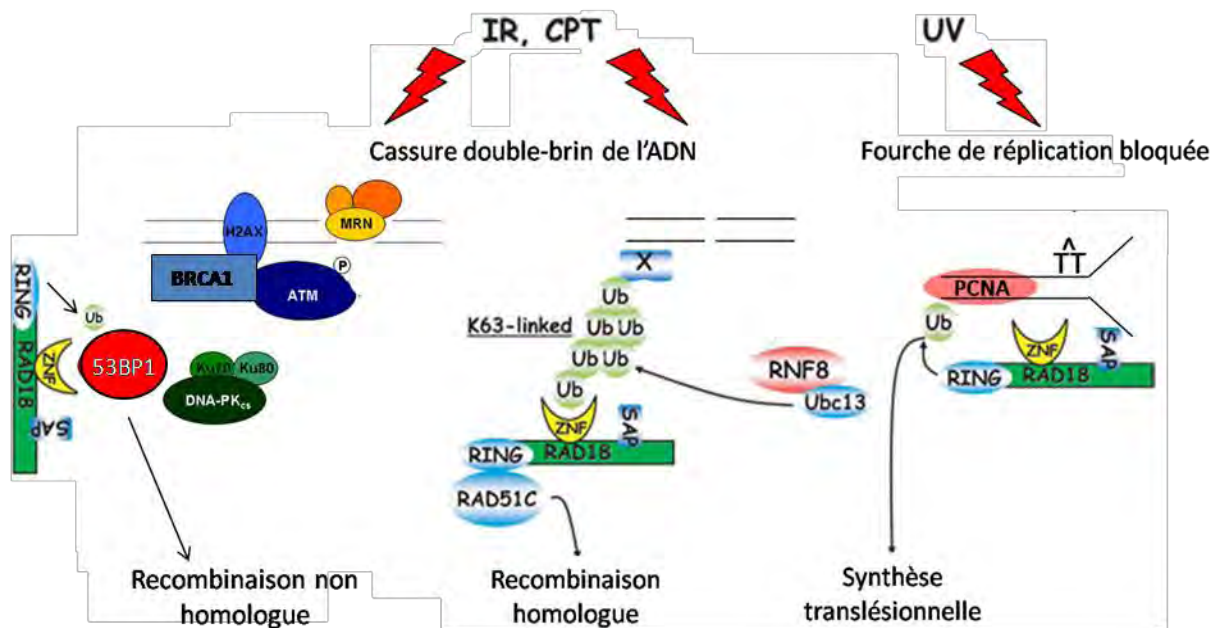


Figure 57: Modèle expliquant la fonction de Rad18 dans la réparation des cassures double-brin de l'ADN et dans la synthèse translésionnelle. En phase G1, Rad18 est recrutée aux foyers IRIFs contenant BRCA1, MRE11/NBS1/RAD50 et 53BP1 grâce à son domaine Zinc Finger qui interagit avec 53BP1. Son activité d'ubiquitine ligase est requise pour le maintien de 53BP1 au niveau de la cassure, ce qui permet la réparation de la cassure par le NHEJ. En dehors de la phase G1, Rad18 pourrait interagir avec l'ubiquitine de protéine(s) inconnue(s) (indiquées X) poly-ubiquitinée(s) par le complexe RNF8/UBC13. Le domaine RING est nécessaire pour l'interaction avec Rad51, menant la réparation des cassures par la recombinaison homologue. En réponse aux UV, Rad18 colocalise avec PCNA et mono-ubiquitine cette protéine grâce à son domaine RING. Le domaine SAP est nécessaire pour la localisation de Rad18 aux dommages. Adapté de Huang et al., 2009 et Adams and Carpenter, 2006 .

3. Les modifications post-traductionnelles de Rad18

Rad18 est **mono et poly--ubiquitinée** par **auto-ubiquitination** (Miyase et al., 2005) (Figure 58).

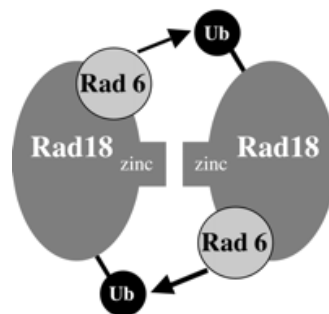


Figure 58: Modèle d'auto-mono-ubiquitination de Rad18. Deux molécules de Rad18 interagissent par l'intermédiaire de leur doigt de zinc (zinc) et se mono-ubiquitinent l'une l'autre. Miyase et al., 2005.

Une étude a montré que quatre lysines (K161, K261, K309 et K318) de Rad18 de souris peuvent être mono-ubiquitinées *in vitro* en présence de Rad6 (Notenboom et al., 2007; Figure 56). **Rad18 ubiquitinée** est préférentiellement détectée dans le **cytoplasme** et la **forme non ubiquitinée dans le noyau** (Miyase et al., 2005).

Rad18 est également **phosphorylée** au niveau des sérines **99 et 471 dans des extraits de noyaux de cellules HeLa non synchronisées** (Beausoleil et al., 2004). La phosphorylation de la sérine 99 n'est pas stimulée par le facteur de croissance EGF (Olsen et al., 2006). Lors de l'étude des protéines des fuseaux mitotiques de cellules HeLa, il a été montré que **ces deux sérines et les sérines 103 et 409 sont phosphorylées**. (Nousiainen et al., 2006). Enfin, la **sérine 403 est phosphorylée par ATM en réponse à un traitement aux radiations ionisantes** (Matsuoka et al., 2007).

4. La localisation de Rad18 durant le cycle cellulaire en absence de dommages induits

En absence de dommages sur l'ADN, la localisation de Rad18 dans le noyau change en fonction de la phase du cycle cellulaire dans les HeLa (Inagaki et al. 2009).

En phase G1, Rad18 est **distribuée de manière homogène dans le noyau à l'exception de un ou deux larges foyers** dans 84% des cellules (Inagaki et al. 2009). Une autre étude montre cependant que dans les GM1604, Rad18 ne forme de foyers que dans 5% des cellules (Watson et al., 2008).

Au cours de la phase S, de nombreux foyers de **taille non homogène** se forment dans les HeLa et les GM637 (Inagaki et al., 2009; Watanabe et al., 2004) mais pas dans les GM1604 où l'on n'observe pas de foyers. De plus, cette localisation est **indépendante de celle de PCNA**. Ainsi, en phase S, seuls 20 % des foyers de Rad18 co-localisent avec PCNA (Watanabe et al., 2004; Inagaki et al., 2009).

En G2, ces foyers sont toujours présents et **en fin de G2**, Rad18 est localisée dans le **nucléole** (Inagaki et al., 2009).

Enfin, Rad18 **co-localise avec des protéines associées à la réparation des cassures double-brin de l'ADN**, soit avec Rad51 et RPA, soit avec Ku86 en phase G1; avec Rad51 et γ H2AX en phase S (Inagaki et al., 2009). Ces données indiquent que Rad18 est présente aux sites de cassures double-brin de l'ADN reconnus soit par les protéines du NHEJ (Ku) soit par celles de la recombinaison homologue (RPA et Rad51).

5. Relocalisation de Rad18 après dommages

En réponse à des traitements induisant des lésions de l'ADN, Rad18 relocalise aux sites de dommages. Les données bibliographiques concernant cette relocalisation au cours du cycle cellulaire sont contradictoires, les uns ne la visualisant que lors de la phase S et les autres dans toutes les phases. Des modifications post-traductionnelles de Rad18 (ou d'un de ses partenaires) pourraient être à l'origine de l'accumulation de Rad18.

- Relocalisation en fonction de la phase du cycle cellulaire

Des études montrent qu'après irradiation UV, Rad18 forme de nombreux foyers de taille homogène **en phase S uniquement et colocalise alors avec PCNA** (Watanabe et al., 2004; Masuyama et al., 2005; Watson et al., 2008; Watanabe et al., 2009). Ces données nous indiquent que **la formation des foyers en réponse à des dommages UV est strictement dépendante de la réplication de l'ADN.**

Cependant, deux études montrent que **les foyers Rad18 s'accumulent aux sites de dommages indépendamment de la réplication de l'ADN** (Nakajima et al., 2006; Anagaki et al., 2009). Quand les cellules sont irradiées aux UV-C, Rad18 s'accumule au niveau des CPD en phase S (100% des cellules) mais aussi en G1/S (47% des cellules) et en G2 (55% des cellules) (Nakajima et al., 2006). De plus, **PCNA et Rad18 co-localisent quelle que soit la phase du cycle cellulaire** après irradiation aux UV-C induisant uniquement des lésions de l'ADN (Inagaki et al., 2009).

En accord avec ces données, une étude a montré que PCNA peut être mono-ubiquitiné en G1 ou en G2 en réponse à un traitement aux UV (Soria et al., 2006). Le **recrutement de PCNA aux dommages UV est indépendant de la phase du cycle cellulaire et requiert NER** (Essers et al., 2005); en revanche, **Rad18 s'accumule aux sites de dommages induits par les UV dans des mutants de XPA et de XPC**, donc indépendamment du mécanisme NER (Nakajima et al., 2006).

- Modifications post-traductionnelles éventuelles de Rad18

Une étude a montré que **l'accumulation de Rad18 aux fourches de réplication bloquées par un traitement au MMS des cellules de Hamster impliquerait la phosphorylation de la protéine** (ou d'une autre interagissant avec elle) par une kinase pouvant être inhibée par la wortmannine ou la staurosporine mais pas par la roscovitine (Nikiforov et al., 2004). La staurosporine inhibe différentes kinases, comme la kinase C, les

kinases Cdk et Chk1 (Zhao et al., 2002). La wortmannine inhibe notamment ATR, ATM et DNA-PK (Ward and Chen, 2001; Wang et al., 2001) et la roscovitine inhibe les kinases Cdk. Dans cette étude, les auteurs proposent que les kinases du checkpoint de la réplication pourraient être impliquées (Nikiforov et al., 2004).

Etant donné l'effet de la wortmannine sur la relocalisation de Rad18 après dommages dans les cellules en culture, nous avons testé **l'effet de la mutation de chacun des trois sites SQ/TQ de Rad18 sur sa localisation nucléaire et sur son activité en réponse à des dommages UV**. Nous avons aussi cherché à savoir si **des inhibiteurs de kinases inhiberaient également la mono-ubiquitination de PCNA *in vitro***.

B. Effets de mutations de Rad18 sur sa localisation et son activité *in vivo*

Nous avons analysé **l'effet de trois mutations dans Rad18 sur sa localisation et son activité d'ubiquitine ligase en réponse aux dommages de l'ADN induits par les UV**.

Rad18 possède **trois sites SQ/TQ, T58/Q59, S368/Q369 et S403/Q404**, qui pourraient être reconnus par les sérine-thréonine kinases. Il est intéressant de noter que la sérine 403 est phosphorylée par ATM en réponse à une irradiation ionisante (Matsuoka et al., 2007). La thréonine T58 est située dans le domaine RING finger, impliqué dans l'activité d'ubiquitine ligase de Rad18 et dans la liaison avec Rad6. La sérine S368 est située dans le domaine de liaison à Rad6 et la sérine S403 dans le domaine de liaison à Pol η (Figure 59).

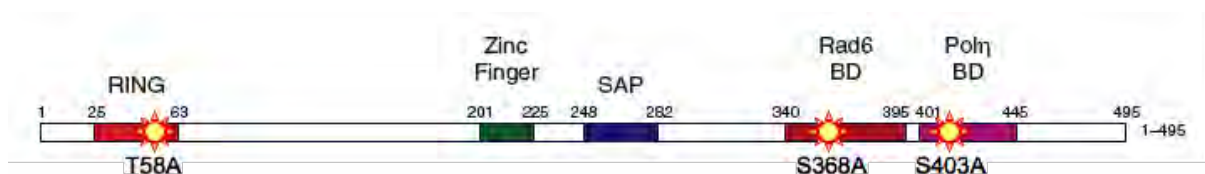


Figure 59: Position des trois mutations testées. La thréonine 58 se trouve dans le RING finger, la sérine 368 est située dans le domaine d'interaction avec Rad6 et la sérine 403 est localisée dans le domaine de liaison avec Pol η . Adapté de Notenboom et al., 2007.

Le plasmide pcDNA HA-Rad18 a tout d'abord été modifié par l'introduction de trois mutations silencieuses dans l'ADN codant pour Rad18 pour permettre son expression dans la lignée MRC5-Rad18^{KD} (dans laquelle Rad18 est stablement éteinte par interférence à ARN). Ce plasmide, nommé pcDNA HA-Rad18*, a été la cible d'une mutagenèse dirigée sur les nucléotides codant pour les résidus **T58, S368 et S403** (voir matériel et méthode supplémentaires).

1. Localisation de Rad18 dans la lignée MRC5 en absence ou en présence de dommages induits par les UV

Nous avons analysé la localisation de Rad18 dans une lignée de cellules MRC5 non synchronisées. Par FACs, nous avons déterminé que 58, 22 et 20 % des cellules sont en phase G1, S et G2 respectivement.

Dans cette population cellulaire, en absence de dommages induits par les UV, Rad18 est localisée dans le noyau sous deux formes: l'une diffuse et l'autre sous forme de foyers de taille non homogène. La visualisation de l'une ou l'autre forme dépend de la méthode de fixation employée. Dans les cellules fixées au formaldéhyde, Rad18 est en majorité diffuse dans le noyau et quelques foyers sont visibles. Avec le méthanol/acétone (v/v), les foyers sont très visibles.

Lorsqu'on irradie les cellules aux UV, Rad18 se disperse et forme de nombreux foyers de taille homogène dans l'heure qui suit l'irradiation. Cette localisation est toujours visible 4 heures après le traitement des cellules (Figure 60). Nous avons aussi analysé la localisation de HA-Rad18 dans la lignée MRC5 HA-Rad18 à l'aide d'un anticorps HA. Nous observons le même profil. Pour mieux visualiser Rad18, nous avons par la suite toujours fixé les cellules au méthanol/acétone.

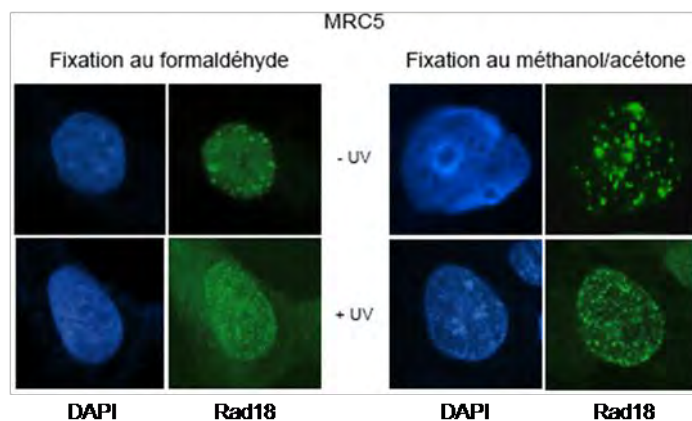


Figure 60: Localisation de Rad18 dans les cellules MRC5 non synchronisées, non irradiées ou irradiées aux UV (15 J/m²). La fixation des cellules a lieu 4 heures après l'irradiation. Deux fixations ont été testées: formaldéhyde 4% ou méthanol/acétone (v/v). Rad18 est visualisée grâce à un anticorps dirigé contre Rad18.

La localisation de Rad18 dans le noyau en fonction des phases du cycle cellulaire et en réponse à des dommages sur l'ADN induits par des radiations UV est controversée (voir données bibliographiques sur Rad18). Dans la lignée MRC5 en réponse aux UV, **la relocalisation de Rad18 ne dépend pas de la phase du cycle cellulaire**. Il serait intéressant

de visualiser la localisation de PCNA en réponse aux UV et de voir si les deux protéines colocalisent.

2. Localisation intracellulaire des trois mutants de Rad18

Nous avons analysé la localisation des mutants de Rad18 dans le noyau *in vivo* par immunofluorescence en utilisant un anticorps dirigé contre l'épitope HA.

Aucune des trois mutations n'a d'impact sur la localisation de Rad18 après irradiation, impliquant que la relocalisation de Rad18 après UV ne dépend pas des trois résidus mutés (Figure 61).

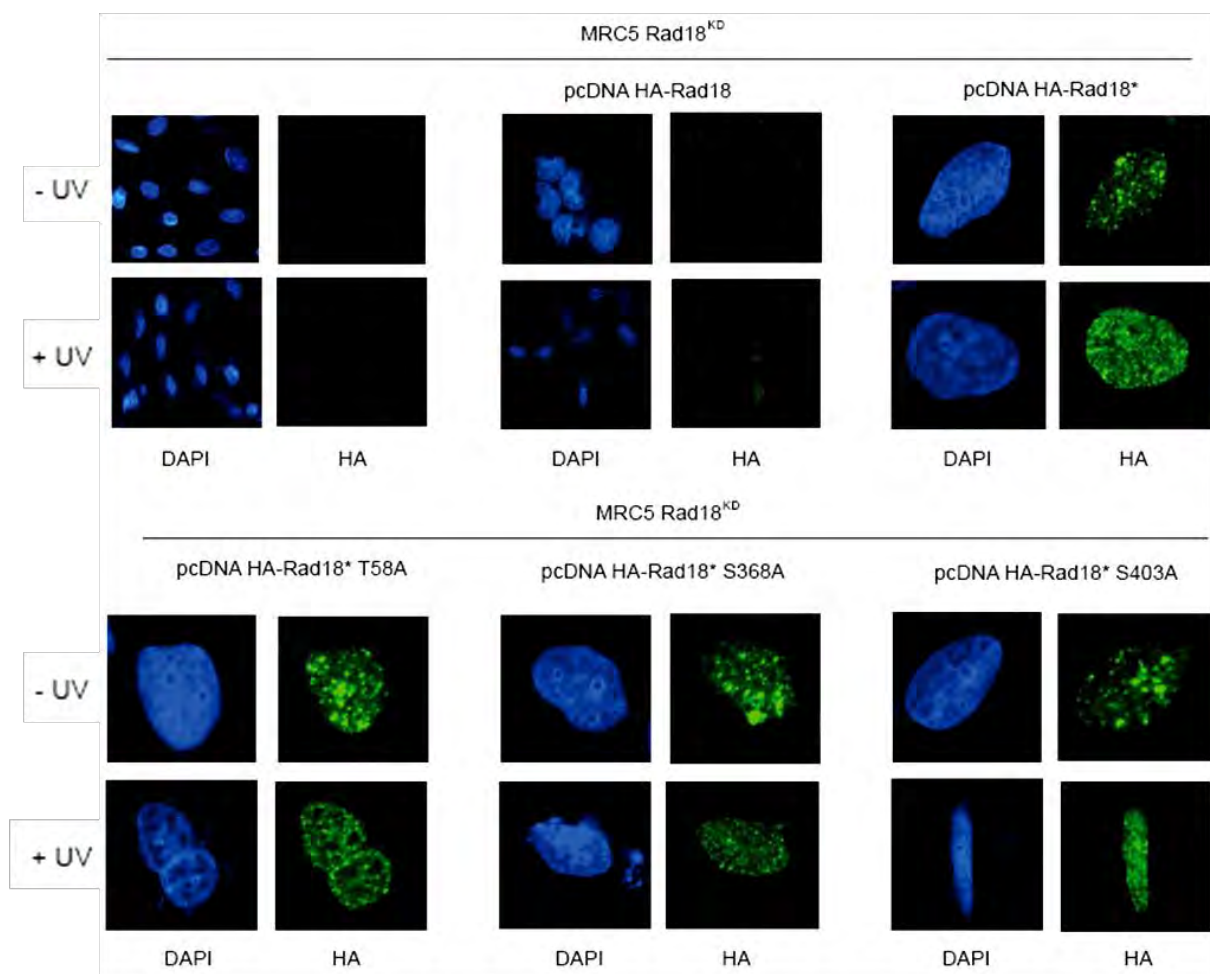


Figure 61: Localisation nucléaire des différents mutants de Rad18 en réponse aux UV. HA-Rad18 est visualisée grâce à un anticorps dirigé contre HA.

3. Effets des trois mutations de Rad18 sur la mono-ubiquitination de PCNA en réponse aux UV

L'effet des mutations de Rad18 sur son activité est testé par l'analyse de la mono-ubiquitination de PCNA dans les cellules après irradiation aux UV. Les plasmides exprimant les différentes versions de Rad18 sont transfectés transitoirement dans la lignée MRC5 Rad18^{KD}. Les plasmides pcDNA HA-Rad18 et pcDNA HA-Rad18* servent de contrôles négatif et positif. L'utilisation de l'anticorps dirigé contre HA permet de vérifier que la transfection des plasmides a bien eu lieu car nous visualisons dans chaque cas (à part dans le contrôle négatif MRC5 Rad18KD transfecté avec le plasmide pcDNA HA-Rad18) les deux bandes de 75 et de 85 kDa attendues pour Rad18.

Seule **la mutation T58A semble avoir un effet négatif sur l'activité de Rad18, contrairement aux mutations S368A et S403A** (Figure 62 A). Il est intéressant de noter que ce mutant est toujours capable de s'auto-ubiquitiner puisque nous visualisons par Western Blot les deux formes de Rad18, bien que la thréonine T58 soit située dans le domaine RING Finger de Rad18, impliqué dans l'activité d'ubiquitine ligase. Pour vérifier le phénotype de ce mutant, nous avons exprimé de manière stable HA-Rad18*T58A dans les cellules MRC5-Rad18^{KD}. De manière surprenante, **la mutation T58A n'a pas d'impact sur la mono-ubiquitination de PCNA en réponse aux UV dans les clones stables** (Figure 62 B).

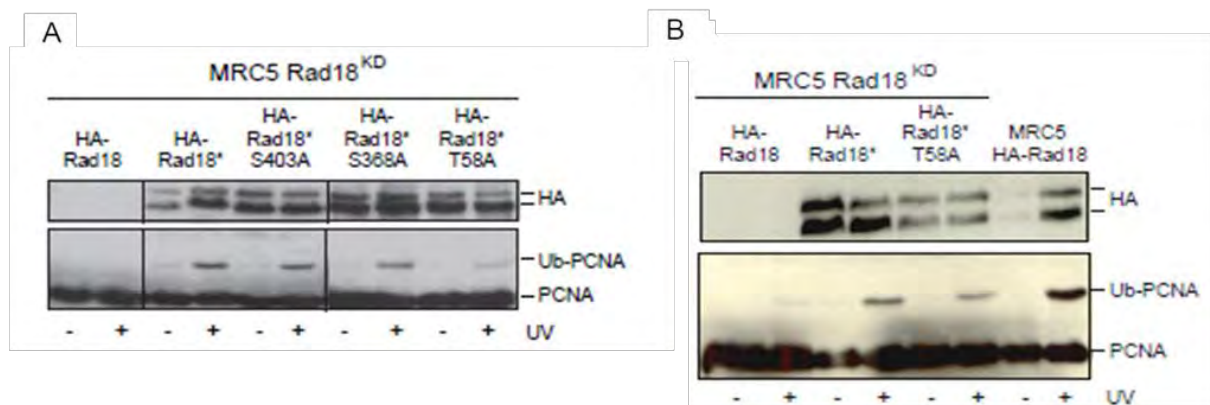


Figure 62: Effets des mutations S368A, T58A et S403A sur la mono-ubiquitination de PCNA après irradiation des cellules aux UV (30J/m²). **A.** 48 heures après transfection avec les plasmides indiqués, les cellules sont irradiées aux UV (30 J/m²). La mono-ubiquitination de PCNA est analysée par Western Blot 6 heures après l'irradiation. **B.** Des cellules exprimant stablement HA-Rad18, HA-Rad18* et HA-Rad18*T58A sont irradiées ou non aux UV. La mono-ubiquitination de PCNA et HA-Rad18 sont visualisés par Western Blot grâce à des anticorps dirigés contre PCNA et HA. Il est à noter qu'une erreur de dépôt est certainement à l'origine de l'absence de HA dans la lignée MRC5 HA-Rad18 non irradiée.

C. Effet d'inhibiteurs de kinases sur la mono-ubiquitination de PCNA *in vitro*

Nous avons testé l'effet de différents inhibiteurs de kinases PI3K sur la mono-ubiquitination de PCNA *in vitro*, lors de l'élongation de l'amorce d'un ADN simple-brin incubé avec un extrait MRC5. Nous avons testé la wortmannine, la caféine et deux inhibiteurs spécifiques d'ATM (Ku55933) et de DNA-PK (Ku57788) (Tableau 5). Nous n'avons pas testé d'inhibiteurs spécifiques d'ATR, plusieurs études ayant montré que cette protéine n'est pas impliquée dans la mono-ubiquitination de PCNA (Frampton et al., 2006; Chang et al., 2006; Davies et al., 2008 ; Niimi et al., 2008).

Tableau 5: Les inhibiteurs testés et leurs cibles.

| Inhibiteurs testés | Cibles | IC50 <i>in vitro</i> | Bibliographie |
|--------------------|---|---|--|
| Wortmannine | Les kinases PI3K et PIKK | 250 nM mTOR 150 nM ATM 1.8 µM ATR 16 nM DNA-PK | Brunn et al., 1997; Sarkaria et al., 1998 (10 µM de γATP); |
| Caféine | Inhibiteurs des points de contrôles du cycle cellulaire | 0.2 mM ATM 1.1 mM ATR 10 nM DNA-PK 5mM Chk1 | Sarkaria et al., 1999 (10 µM de γATP) |
| Ku57788 | DNA-PK | 14 nM | Leahy et al., 2004 (50 µM d'ATP) |
| Ku55933 | ATM | 13 nM | Hickson et al., 2004 (0.5 à 100 µM d'ATP) |

Chaque extrait est incubé 30 min à 4°C avec l'inhibiteur, puis en présence de l'ADN et des dNTPS 20 minutes à 37°C. L'analyse par Western Blot des extraits cellulaires après l'incubation montre que **la wortmannine et l'inhibiteur de DNA-PK ont un effet négatif sur la mono-ubiquitination de PCNA** alors que la caféine et l'inhibiteur d'ATM n'ont aucun effet sur cette modification (Figure 63 A).

Nous avons effectué le même test en présence d'une gamme de concentration d'inhibiteurs spécifiques de DNA-PK et d'ATM. L'effet des inhibiteurs sur la mono-ubiquitination de PCNA et sur la phosphorylation de RPA32 est analysé par Western Blot. En parallèle, l'analyse en gel dénaturant des produits de l'élongation permet de contrôler l'impact des inhibiteurs sur la réplication de l'ADN. **L'inhibition d'ATM n'a aucun impact** sur la phosphorylation de RPA32, la mono-ubiquitination de PCNA et l'élongation de l'amorce (Figure 63 B et C). Par contre, **l'inhibition de DNA-PK diminue la phosphorylation de RPA32 et la mono-ubiquitination de PCNA à partir de 1 μ M** (Figure 63 B). En présence de cet inhibiteur, on observe **un produit d'élongation supplémentaire** qui correspond à un arrêt de la polymérase répliquative juste avant la première hairpin, un **arrêt supplémentaire entre la deuxième et la troisième hairpin** et **une diminution de l'efficacité de la synthèse d'ADN** (Figure 63 C). Ces arrêts ne sont pas des signaux induisant la mono-ubiquitination de PCNA puisque la quantité de PCNA modifié n'augmente pas. De plus, la diminution de l'efficacité de la réplication n'est pas reliée à un effet de compétition entre l'ATP et les inhibiteurs puisque nous n'observons aucun changement en présence de l'inhibiteur d'ATM (Figure 63 B et C).

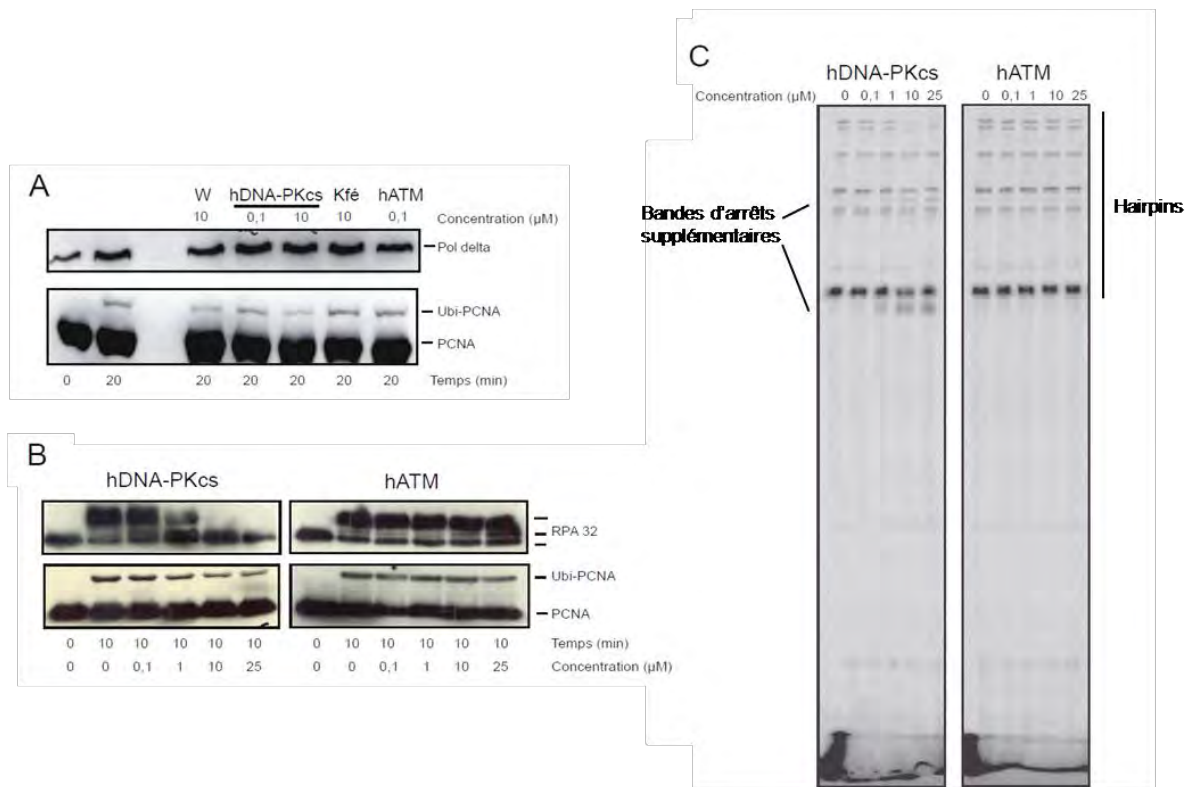


Figure 63: Effet de différents inhibiteurs de kinases sur la mono-ubiquitination de PCNA *in vitro*. **A.** L'extrait MRC5 est incubé 30 minutes à 4°C en présence des concentrations indiquées de chaque inhibiteur (h pour inhibiteur, W pour Wortmannine et Kfé pour caféine). Chaque extrait est ensuite incubé 20 minutes à 37°C en présence de 10 fmole d'un ADN simple-brin circulaire hybridé à une amorce et les 4 dNTPs en absence d'ATP. Par Western Blot, nous avons visualisé Pol δ (contrôle de dépôt) et PCNA grâce à des anticorps spécifiques. **B et C.** L'extrait MRC5 est incubé en présence de quantité croissante de hDNA-PKcs ou hATM 30 minutes à 4°C. Chaque extrait est ensuite incubé 10 minutes en présence de l'ADN hybridé à une amorce radiomarquée, de 4 μ M d'ATP et de 40 μ M de dNTPs. Les échantillons ont été divisés en deux. L'un a permis une analyse par Western Blot de l'effet des inhibiteurs sur la phosphorylation de RPA32 et sur la mono-ubiquitination de PCNA. L'autre a permis l'analyse des produits de réplication par électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence d'urée.

L'effet de l'inhibiteur de DNA-PK sur la mono-ubiquitination de PCNA dans ce système serait donc **indirect** en inhibant la synthèse d'ADN et le blocage à la première hairpin qui induisent la mono-ubiquitination de PCNA.

DNA-PK, membre de la famille des PIKK, est composé de trois sous-unités: la sous-unité catalytique DNA-PKcs et le dimère Ku70/Ku80 qui lie l'ADN et recrute la sous-unité catalytique au site de la lésion (Lee and Kim, 2002). DNA-PK est activée par les cassures double-brin de l'ADN. Un des aspects marquants de l'activité de DNA-PK est la grande diversité de ses cibles. Elle peut ainsi phosphoryler certains de ses partenaires de la voie de réparation des cassures double-brin par recombinaison non-homologue tels Artemis ou XRCC4, stimulant en conséquence le traitement et la ligation des extrémités de la cassure (Ma et al., 2002; Yu et al., 2003). DNA-PK présente aussi la faculté de **s'autophosphoryler** au cours du processus du NHEJ, ce qui permet de contrôler l'accessibilité du site de coupure pour les autres facteurs de réparation: dans la version non phosphorylée de DNA-PKcs, les extrémités de la coupure ne sont pas accessibles, tandis que son auto-phosphorylation

entraîne un changement conformationnel et ouvre l'accès au site de dommage (Ding et al., 2003; Cui et al., 2005). DNA-PKcs peut aussi **phosphoryler différents facteurs de la signalisation et de la réponse cellulaire aux dommages de l'ADN comme la protéine de réplication A (RPA)**, pouvant ainsi participer à la signalisation des dommages de l'ADN (Brush et al., 1994) ou encore l'histone H2AX (Park et al., 2003).

Dans un système *in vitro* de protéines purifiées, DNA-PK est activée par des structures secondaires d'un ADN simple-brin circulaire de type M13. La phosphorylation de substrats (comme p53 et RPA32) est en compétition avec une autophosphorylation rapide de DNA-PK qui inactive son activité kinase. De plus, l'interaction de ses substrats (y compris une autre molécule de DNA-PK) avec l'ADN est requis pour la phosphorylation (Soubeyrand et al., 2001). Dans l'extrait cellulaire, **DNA-PK pourrait alors reconnaître les structures secondaires du substrat de type épingle à cheveux** (Hammarsten and Chu, 1999) et **phosphoryler RPA32**. Cette hypothèse est confortée par le fait que nous avons capturé les protéines Ku70 et Ku80 sur l'ADN en cours d'élongation (Figure 55). **Le blocage en amont de la première hairpin lors de l'élongation pourrait être du à la présence de DNA-PK sur l'ADN qui n'a pas pu se désactiver en raison de la présence de l'inhibiteur.**

Pour tester l'implication de DNA-PK dans la mono-ubiquitination de PCNA *in vivo*, Patrick Calsou nous a fourni deux lignées cellulaires humaines issues d'un glioblastome (tumeur du cerveau), l'une déficiente pour DNA-PKcs (Fus9) et l'autre complétée avec DNA-PKcs (Fus1) (Virsik-Köpp et al., 2004). **La modification de PCNA après UV est inefficace** dans les deux types cellulaires, ce qui ne nous permet pas de savoir si l'absence de DNA-PK a un impact sur la modification de PCNA.

D. Conclusion et perspectives

Toutes les données présentées ci-dessus indiquent que les sites SQ/TQ que nous avons étudiés ne sont pas des sites impliqués dans l'activité de Rad18 en réponse à des dommages UV.

Les événements moléculaires qui déclenchent la mono-ubiquitination de PCNA par le complexe Rad6/Rad18 sont peu connus. La **caractérisation au niveau moléculaire des complexes protéiques associés à Rad18** et l'étude de la **dynamique de ces complexes en réponse aux agents qui bloquent la réplication** sont donc essentielles. Plusieurs approches sont envisagées, que ce soit *in vitro* ou *in vivo* pour savoir si l'activation du complexe Rad6/Rad18 s'accompagne d'une modification post-traductionnelle de Rad18 (ou de l'une de ses protéines partenaires) et/ou si elle implique un recrutement du complexe au site de la lésion par le biais d'une interaction avec une autre protéine.

Activation de Rad18 *in vitro*:

Grâce à l'**analyse en gel à 2 dimensions des protéines « capturées » à partir d'extraits cellulaires contenant HA-Rad18** (cf pages 105 à 109), nous pourrions détecter **d'éventuelles modifications de Rad18, de Rad6 ou des différentes sous-unités de RPA**, qui accompagneraient le déclenchement de la mono-ubiquitination de PCNA. Ces modifications pourront être détectées par immunoblot et par spectrométrie de masse.

Activation de Rad18 *in vivo*:

En réponse aux UV, Rad18 est relocalisée au sein du noyau. Afin de savoir si cette relocalisation correspond effectivement à une **modification post-traductionnelle de la protéine ou de l'un de ses partenaires**, nous pouvons analyser la **migration des protéines en gel à 2 dimensions**.

L'impact du traitement des cellules à des agents bloquant la progression des fourches de réplication, comme une irradiation UV, l'hydroxy-urée ou encore l'aphidicoline, pourra notamment être analysée au cours d'une cinétique.

Des extraits correspondant à des **fractions cellulaires différents** (extrait cytoplasmique ou nucléaire, protéines associées à la chromatine...) pourront être réalisés afin de **corrélérer éventuellement une modification post traductionnelle à une appartenance spécifique à un compartiment cellulaire particulier**.

Parallèlement à cette étude, nous pourrions aussi réaliser des expériences d'**immunoprécipitation d'HA-Rad18** par l'intermédiaire d'un anticorps anti-HA de façon à comparer les complexes protéiques obtenus en absence ou en présence d'agents bloquant la réplication. Nous pourrions ainsi déterminer si le blocage de la réplication est corrélé avec un **renforcement des interactions** déjà connues entre Rad18/Rad6 et entre Rad18/RPA (analyse par immunoblot) ou si de **nouvelles interactions** apparaissent (analyse par spectrométrie de masse).

Ces différentes expériences, en parallèle de l'étude de la composition du complexe de réplication (voir précédemment) contribueront à préciser le signal moléculaire qui conduit à l'activation de Rad6/Rad18 et à la mono-ubiquitination de PCNA, première étape essentielle de la régulation de la synthèse translésionnelle. Cette approche ouvrira ainsi de nouvelles voies d'exploration dans ce domaine.

Deuxième partie:
Etude de la contribution des domaines
PIP et UBZ de Pol η lors du
franchissement des lésions TT-CPD et
G-AAF dans des extraits de cellules
humaines

1. Introduction

Le mécanisme par lequel les ADN polymérases translésionnelles accèdent aux lésions et prennent la place des ADN polymérases réplcatives pour incorporer un nucléotide en face de la base endommagée fait l'objet d'intenses recherches. De nombreuses études ont pointé du doigt l'importance des anneaux de processivité des ADN polymérases réplcatives (β -clamp chez les procaryotes et PCNA chez les eucaryotes) pour la réplcation de l'ADN endommagé. Dans les cellules humaines, **Pol η , Pol ι et Polk interagissent avec PCNA via un domaine PIP** (PCNA-interacting peptide) (Haracska et al., 2001a; Haracska et al., 2001d; Haracska et al., 2002a). **L'inactivation de ce motif chez Pol η sensibilise les cellules de levure aux irradiations UV** (Haracska et al 2001b), tandis que de telles mutations ne confèrent qu'une **sensibilité modérée aux UV dans les cellules humaines** (Bienko et al., 2005; Gueranger et al., 2008; Bienko et al., 2010), suggérant un **mécanisme de recrutement alternatif pour cette polymérase chez l'homme**.

Le traitement des cellules humaines et de levure à des agents qui affectent la réplcation de l'ADN entraîne le mono-ubiquitination de PCNA au niveau de son résidu K164 par le complexe Rad6/Rad18 (Hoegge et al., 2002). Des études génétiques **chez *S.cerevisiae***, ont mis en évidence une relation épistatique entre la mutation K164R de PCNA (forme non ubiquitination de PCNA) et la délétion des polymérases translésionnelles Pol η et Pol δ , ce qui démontre que **la TLS dans cet organisme est largement dépendante de la mono-ubiquitination de PCNA** (Stelter and Ulrich., 2003). Les ADN polymérases membres de la famille Y interagissent préférentiellement avec cette forme modifiée de PCNA (Kannouche and Lehmann, 2004; Watanabe et al., 2004; Bienko et al., 2005; Parker et al., 2007; Plosky et al., 2006; Wood et al., 2007) grâce à des **domaines de liaison à l'ubiquitine appelés UBZ** (chez Pol η et Polk) ou **UBM** (chez Pol ι et Rev1) (Bienko et al., 2005; Guo et al., 2006; Plosky et al. 2006; Guo et al., 2008). De plus, il a été observé que la mutation C638A dans le domaine UBZ de Pol η affecte plus la survie des cellules aux UV que des mutations du domaine PIP (Bienko et al., 2005). Il a alors été proposé que **la liaison des ADN polymérases translésionnelles à l'ubiquitine de PCNA via le domaine UBZ est requise pour leur accès aux fourches de réplcation bloquées**.

Des résultats récents ont cependant modéré l'importance de la modification de PCNA. En effet, des analyses de différentes mutations du domaine UBZ de Pol η conduites par Acharya et al (Acharya et al., 2007; Acharya et al., 2008) ont suggéré que **la survie des**

cellules aux UV et la liaison à l'ubiquitine ne sont pas nécessairement liés. En effet, les mutants D652A, H654A et F655A sont très sensibles aux UV alors que les mutants C635A et H650A ne le sont pas. Or tous ces acides aminés sont nécessaires pour la liaison à l'ubiquitine. De plus, Sabbioneda et al. ont montré que l'ubiquitination de PCNA n'est pas nécessaire pour la relocalisation de Pol η dans les foyers de réplication après UV mais elle augmente le temps de résidence de la protéine dans ces foyers (Sabbioneda et al., 2008). Le domaine UBZ, nécessaire pour la fonction de Pol ϵ dans la TLS, permettrait l'interaction avec des protéines autres que PCNA (Sabbioneda et al 2009).

En plus de son rôle dans l'accès des polymérase translésionnelles au site de lésion, la mono-ubiquitination de PCNA favorise l'activité de Pol η ou Rev1 de levure lors du franchissement d'un site abasique *in vitro* (Garg et al., 2005). Cependant, une telle activation de Ub-PCNA n'a pas été confirmée dans une autre étude (Haracska et al., 2006). Enfin, **la TLS dans les cellules de vertébrés est seulement partiellement dépendante de l'activité de Rad18.** Dans les cellules de souris Rad18^{KO}, la mutagenèse due aux UV est seulement réduite d'un facteur deux (Tateishi et al., 2003). De plus, un défaut d'ubiquitination dans les DT40 n'est pas épistatique des mutants Polk et Rev1 en ce qui concerne la sensibilité aux UV (Okada et al., 2002; Edmunds et al., 2008), ce qui indique qu'au moins ces deux polymérase peuvent être recrutés indépendamment de Rad18.

La régulation de la TLS par la mono-ubiquitination de PCNA reste, au vu de la littérature, très discutée. Pour élucider ces mécanismes, nous avons utilisé un test de TLS *in vitro* dans des extraits cellulaires compétents pour la mono-ubiquitination de PCNA (voir partie 1) et la TLS.

2. Résultats et discussion

A. Pol η et PCNA sont impliqués dans le franchissement du G-AAF et du TT-CPD dans les extraits de cellules humaines

Un ADN simple-brin hybridé à une amorce radiomarquée et portant une lésion unique (TT-CPD ou guanine portant un adduit AAF) est incubé en présence d'extraits de cellules humaines. Dans les extraits cellulaires, Pol η est impliquée dans le franchissement du G-AAF (Cordonnier et al 1999 Mol cell biol; Figure 51) et de la lésion TT-CPD (Figure 67A). En effet, la TLS en face de ces lésions dans les extraits de cellules XP30RO où Pol η est absente est inefficace comparée à celle observée dans les extraits de cellules MRC5 (lignées de fibroblastes issues d'un individu normal) (Figure 51 et Figure 67A). Nous avons vérifié que l'ajout de la protéine Pol η purifiée complémente le défaut de franchissement du G-AAF des extraits issus de la lignée XP30RO (la ligne 2 par rapport à la ligne 1, Figure 64B). Par contre, la complémentation est abolie par la mutation du motif SIDE du site catalytique de Pol η (Figure 64B ligne 3). **La synthèse translésionnelle observée dans les extraits de cellules normales est donc en grande partie dépendante de Pol η** , l'ADN polymérase translésionnelle déficiente dans les cellules XPV. Pol η catalyse l'incorporation du nucléotide en face de la lésion et de quelques nucléotides après la lésion puis est remplacée par la polymérase répliquative. Cet essai permet donc de mimer les étapes successives permettant l'accès des polymérases à l'ADN endommagé et de tester l'influence de la mono-ubiquitination de PCNA sur la TLS.

Nous avons aussi voulu vérifier que PCNA est lui-aussi impliqué dans le franchissement de ces deux lésions. La déplétion de PCNA par la protéine de fusion His-p21 dans un extrait de cellules MRC5 a été réalisée (Figure 64C) (Waga et al., 1994). L'analyse des produits d'élongation par électrophorèse en gel dénaturant montre qu'en l'absence de PCNA, la synthèse d'ADN s'arrête au niveau de la lésion G-AAF ou TT-CPD (Figure 64C colonne 2). La complémentation par la protéine de fusion HA-PCNA permet de retrouver une efficacité de TLS proche de celle de l'extrait de départ, ce qui indique que PCNA est impliqué dans le franchissement des deux lésions testées (Figure 64C). **Dans les extraits cellulaires, l'échange de polymérases lors de la TLS est donc un processus coordonné qui nécessite l'anneau de processivité PCNA.**

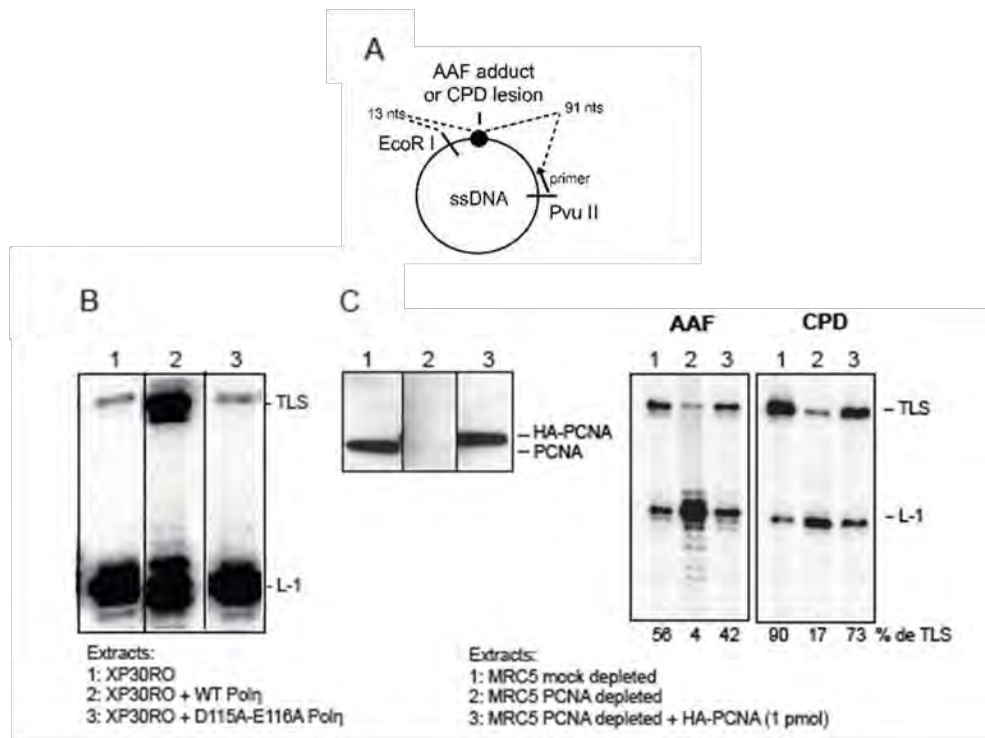


Figure 64: Polη et PCNA sont impliqués dans le franchissement du G-AAF et du TT-CPD dans les extraits de cellules humaines. **A.** Substrat d'ADN utilisé. L'ADN simple-brin est hybridé à une amorce radiomarquée et porte une lésion TT-CPD ou G-AAF. **B.** Les produits de synthèse de l'ADN obtenus après 20 minutes d'incubation avec 30 µg des extraits et l'ADN simple-brin pUC3G1-AAF ont été analysés par électrophorèse sur gel dénaturant. **C.** L'extrait cellulaire MRC5 (100 µg) est mélangé à la protéine de fusion His-p21 liée à des billes magnétiques (Quiagen) dans un volume final de 20 µl dans un tampon (50 mM HEPES-KOH (pH 7.9), 50 mM NaCl) pendant 1h30 à 4°C. Le surnageant dépleted en PCNA est utilisé directement pour la réaction. **A gauche:** analyse par Western Blot avec un anticorps dirigé contre PCNA de l'extrait non dépleted (1), de l'extrait dépleted avec p21 (2). Du HA-PCNA recombinant a été ajouté à l'extrait dépleted en 3. **A droite:** Les produits de l'élongation obtenus après 20 minutes d'incubation avec 10 µg d'extraits et les ADN simple-brin mono-modifiés indiqués sont analysés par électrophorèse sur gel dénaturant. Les produits L-1 et TLS correspondent à une élongation de l'amorce stoppée un nucléotide avant la lésion et à une élongation jusqu'au site de restriction *EcoRI* respectivement.

B. Le franchissement des TT-CPD, contrairement à celui du G-AAF, est indépendant de Rad18 dans les extraits cellulaires

Pour savoir si l'activité de Polη dans les extraits cellulaires est dépendante de l'ubiquitination de PCNA, nous avons comparé l'efficacité de synthèse à travers une lésion TT-CPD ou G-AAF de deux extraits: l'un issu de cellules HCT116 (cellules issus d'un carcinome du colon), l'autre issu de cellules **HCT116 Rad18^{KO}**. Cette lignée cellulaire est plus sensible que les HCT116 à des agents endommageant l'ADN, tels que le cisplatine ou le MMS (methyl methanasulfonate) (Shiomi et al., 2007). En ce qui concerne les UV, la différence de sensibilité entre les deux lignées est détectable uniquement à fortes doses d'irradiation (Figure 65A).

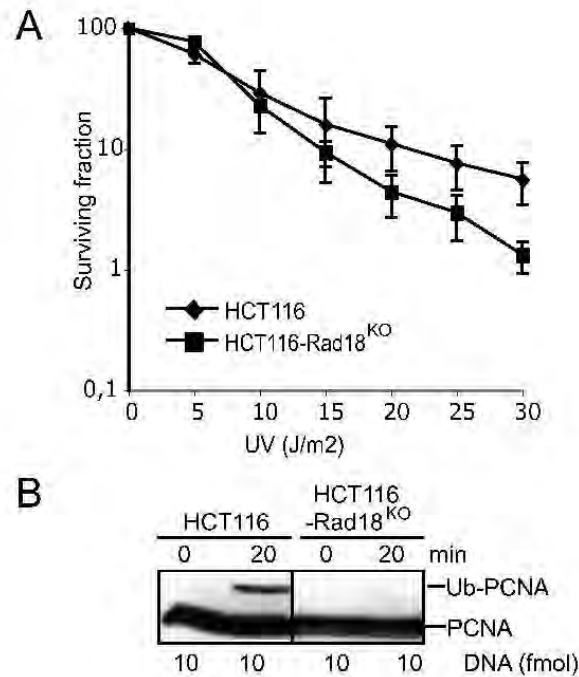


Figure 65: A. Courbes de survie aux UV des cellules HCT116 et HCT116-Rad18^{KO}. 2500 cellules sont ensemencées dans des boîtes de 10 cm de diamètre et irradiées aux doses UV indiquées. Après 7 jours de culture, les cellules sont fixées avec 4% de paraformaldéhyde et colorées au cristal violet. Les clones contenant plus de 50 cellules ont été comptés. **B. Mono-ubiquitination de PCNA *in vitro*.** Les extraits cellulaires (30 µg) sont incubés à 37°C en présence des quatre dNTP et de l'ADN simple-brin (10 fmol) hybridé à une amorce pendant 0 ou 20 minutes, comme indiqué. Les protéines sont analysées par Western Blot avec un anticorps dirigé contre PCNA.

Nous avons également étendu notre analyse en testant l'efficacité de TLS d'une lignée de fibroblastes humains MRC5 dans laquelle Rad18 est stablement éteinte par interférence à ARN. Ces cellules **MRC5-Rad18^{KD}** présentent une plus grande sensibilité aux UV que les lignées MRC5 ou MRC5 exprimant un shRNA non relié (Figure 66A). Dans cette lignée, PCNA n'est plus ubiquitiné en réponse à l'irradiation des cellules aux UV-C. Cependant, si l'on ne voit pas de modification de PCNA *in vivo*, celle-ci est néanmoins visible *in vitro* au cours de l'élongation d'amorce dans les extraits **MRC5-Rad18^{KD}**, impliquant que l'extinction de Rad18 n'est pas à 100% (Figure 66B) contrairement à l'absence totale de Ub-PCNA dans les extraits de HCT116-Rad18^{KO} incubés de la même manière (Figure 65B).

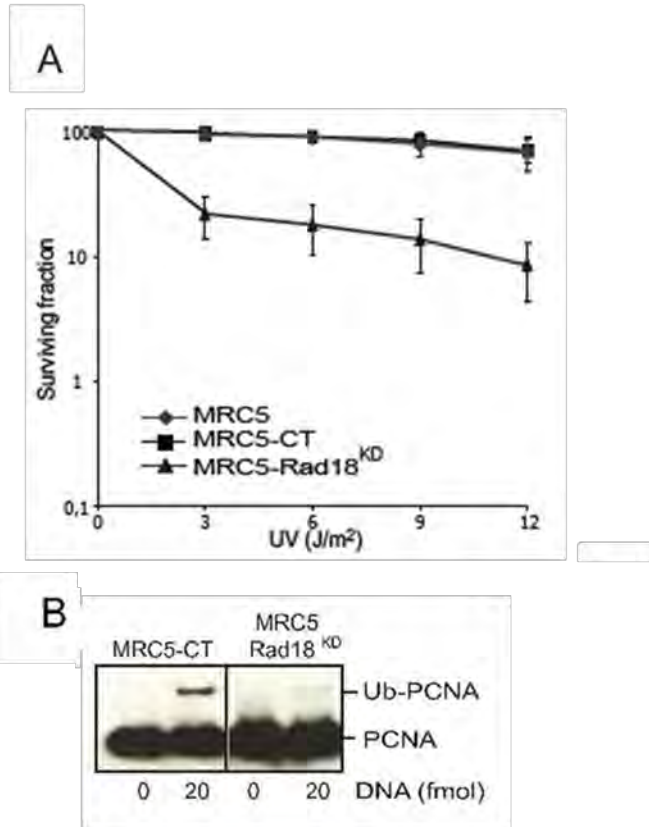


Figure 66: Caractérisation des cellules MRC5-Rad18^{KD}. **A.** Courbes de survie aux UV des cellules MRC5, MRC5-CT (exprimant des shRNA non relié) et MRC5-Rad15^{KD}. 2500 cellules sont ensemencées dans des boîtes de 10 cm de diamètre et irradiées aux doses UV indiquées. Après 7 jours de culture, les cellules sont fixées avec 4% de paraformaldéhyde et colorées au cristal violet. Les clones contenant plus de 50 cellules ont été comptés. **B.** Mono-ubiquitination de PCNA *in vitro*. 30 µg d'extraits sont incubés pendant 20 minutes à 37°C en présence des quatre dNTP et de 0 ou 20 fmol de l'ADN simple-brin hybridé à une amorce, comme indiqué. Les protéines sont analysés par Western Blot avec un anticorps dirigé contre PCNA.

L'analyse de l'efficacité de franchissement des lésions G-AAF et TT-CPD dans les extraits de cellules HCT116, MRC5 et XP30RO montre que **Polη est responsable du franchissement des deux lésions testées**. De plus, **Rad18 n'est pas nécessaire pour le franchissement des TT-CPD mais est requise pour celui du G-AAF**. En effet, les extraits issus des deux lignées déficientes pour Rad18 (HCT116-Rad18^{KO} et MRC5-Rad18^{KD}) sont capables d'effectuer la TLS d'une lésion CPD avec la même efficacité que les extraits de lignées sauvages. Par contre, dans l'extrait HCT116 Rad18^{KO}, la TLS du G-AAF est inexistante. Dans l'extrait MRC5-Rad18^{KD}, l'efficacité de TLS a diminué de 50% par rapport à celle mesurée dans l'extrait contrôle, indiquant que la mono-ubiquitination de PCNA résiduelle visible par Western Blot est sans doute responsable de l'activité restante de TLS dans cette lignée MRC5-Rad18^{KD} (Figure 67 A et B).

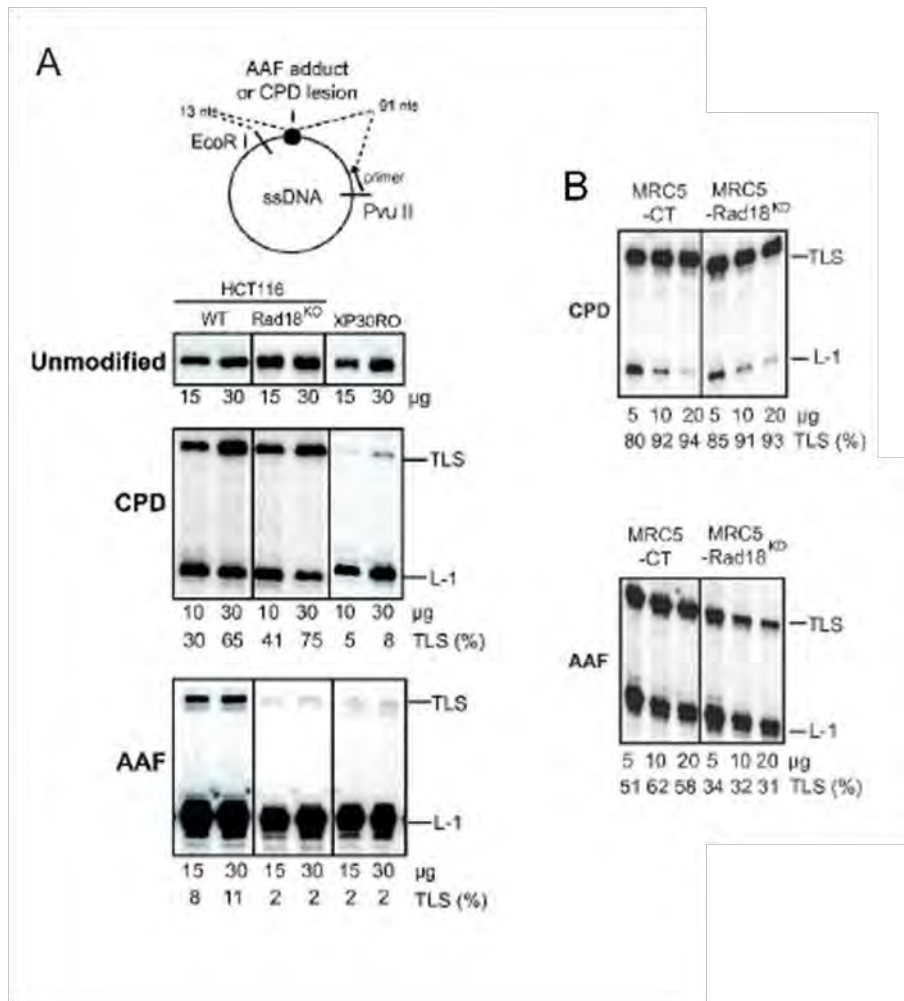


Figure 67: Analyse de la dépendance de Rad18 dans le franchissement des lésions G-AAF et TT-CPD dans les cellules HCT116-Rad18^{KO} et MRC5-Rad18^{KO}. Analyse de la TLS catalysée par les extraits issus des cellules HCT116, HCT116-Rad18^{KO} et XP30RO (**A.**), MRC5-CT et MRC5-Rad18^{KO} à différentes concentrations (**B.**). Les produits de la synthèse d'ADN obtenus après 20 minutes d'incubation avec les ADN simple-brin pUC118 (non modifié), pUC-CPD (CPD) et pUC3G1-AAF (AAF) sont analysés par électrophorèse sur gel dénaturant. Les produits L-1 et TLS correspondent à une élévation de l'amorce stoppée un nucléotide avant la lésion et à une élévation jusqu'au site de restriction *EcoRI* respectivement.

Nos résultats montrent que **le franchissement de la lésion TT-CPD est indépendant de Rad18, ce qui indique qu'il pourrait donc être indépendant de Ub-PCNA.** Cependant, nous ne pouvons éliminer la possibilité d'une **mono-ubiquitination de PCNA mineure, indétectable et indépendante de Rad18.** En effet, plusieurs études ont montré que dans différentes lignées cellulaires, l'absence de Rad18 n'empêche pas totalement la mono-ubiquitination de PCNA (Simpson et al., 2006; Huang et al., 2006; Zhang et al., 2008; Brun et al., 2008; Terai et al., 2010). C'est pourquoi nous avons aussi tenté d'obtenir des cellules exprimant de manière stable la forme non ubiquitinable de PCNA, PCNA-K164R. Pour cela, nous avons essayé d'éteindre le PCNA endogène de la lignée MRC5 exprimant stablement 6His-PCNA-K164R (Niimi et al., 2008) grâce à un shRNA ciblant spécifiquement l'ARN messager endogène. Le PCNA endogène est partiellement éteint dans la lignée MRC5 6His-PCNA-K164R mais nous n'observons aucune diminution de la quantité de PCNA dans la

lignée MRC5 6His-PCNA WT (Figure 68A). De plus, le PCNA résiduel est mono-ubiquitiné lors de l'élongation d'amorce (Figure 68B). Les expériences d'élongation d'amorce en présence d'une lésion TT-CPD ou G-AAF montrent qu'il n'y a pas de différence d'efficacité de franchissement des lésions entre l'extrait contrôle et l'extrait de cellules exprimant PCNA-K164R, indiquant que **le PCNA endogène est encore en trop grande quantité** (Figure 68C). L'efficacité de déplétion de PCNA observée dans la figure Figure 64 nous permet d'envisager la complémentation d'un extrait MRC5-Rad18KD déplété pour PCNA par du PCNA fusionné à l'ubiquitine ou du PCNA K164R. Nous pourrions alors vérifier que le franchissement des lésions TT-CPD et G-AAF est bien indépendant (complémentation avec PCNA K164R) ou dépendant (complémentation avec Ub-PCNA) de la mono-ubiquitination de PCNA.

Une étude récente montre que Pol η est capable d'accéder aux complexes de réplication et de franchir les CPD en présence du mutant K164R non ubiquitinable de PCNA durant la réplication d'un ADN double-brin contenant l'origine de réplication de SV-40 dans des extraits de cellules HeLa (Nikolaishvili-Feinberg et al., 2008). Ceci est en faveur de l'hypothèse que **le franchissement des TT-CPD est indépendant de Ub-PCNA dans notre système, contrairement à celui du G-AAF**.

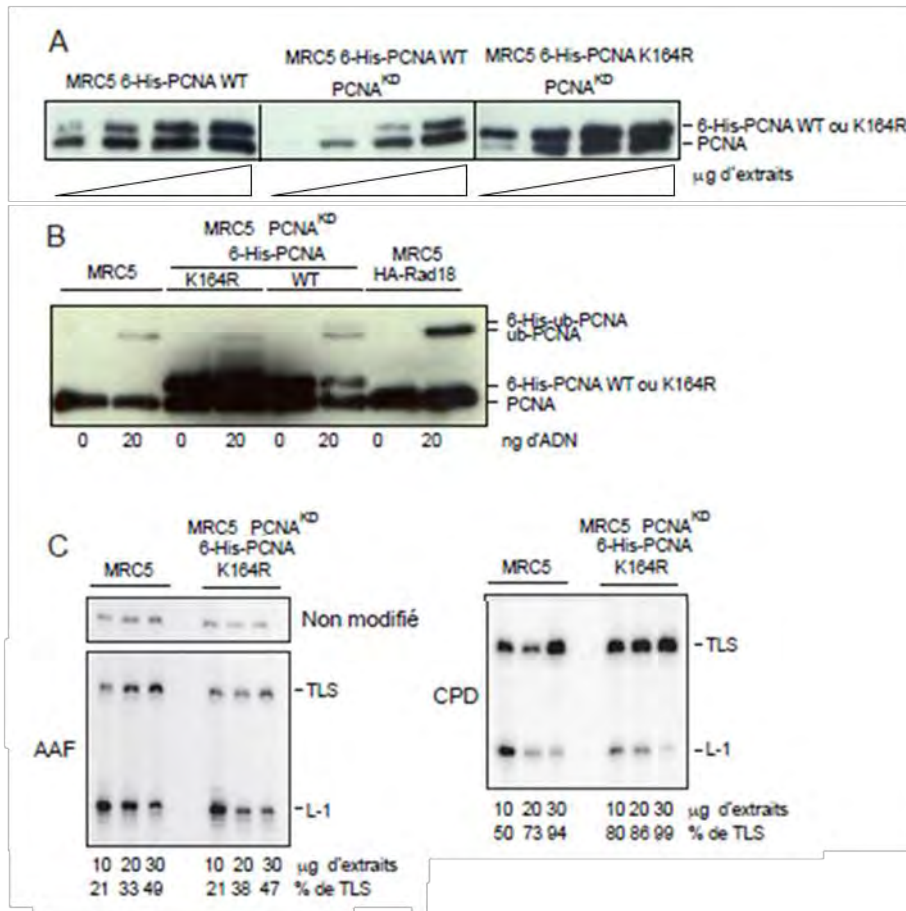


Figure 68: Analyse par immunoblot de l'efficacité du knock down de PCNA endogène dans les MRC5 6-His-PCNA WT et K164R et analyse des produits de l'élongation de l'amorce hybridé au pUC portant une lésion AAF ou CPD . **A.** De 1 à 10 µg de chaque extrait sont analysés par Western Blot avec un anticorps dirigé contre PCNA . **B.** Les différents extraits sont incubés en présence ou en absence d'un substrat d'ADN simple-brin pUC118 hybridé à une amorce 20 minutes à 37°C, en présence de dNTP. PCNA, 6-His-PCNA, PCNA mono-ubiquitiné , 6-His-PCNA et 6-His-PCNA mono-ubiquitiné sont détectés grâce à un anticorps dirigé contre PCNA . **C.** L'élongation de l'amorce radioactive dans les extraits MRC5 et MRC5 6-His-PCNA K164R en présence de dNTP et de pUC118, pUC3G1-AAF ou pUC-CPD est analysée par électrophorèse en gel dénaturant. L'élongation de l'ADN stoppe un nucléotide avant la lésion (L-1). Le fragment TLS correspond à une élongation jusqu'au site de restriction EcoRI (TLS).

Comment expliquer cette différence dans l'activité de TLS de Pol η vis à vis des deux lésions testées, G-AAF et TT-CPD?

Le dimère de thymine de type cyclobutane est la lésion de l'ADN majoritairement formée lorsque les cellules sont irradiées aux UV-C et concerne deux thymines adjacentes du même brin d'ADN (Figure 69A). La déformation induite sur la double hélice a peu d'impact sur l'activité de Pol ϵ . Deux études ont montré que Pol η purifiée chez la levure et chez l'homme peut répliquer un dimère de CPD avec la même cinétique et la même fidélité qu'un dimère T-T non-endommagé (Johnson et al., 2000b; Washington et al., 2000).

Le N $_2$ -acétylaminofluorène réagit avec la guanine en C8 en induisant deux types de lésions, G-AAF et G-AAF (Figure 69B). La formation du G-AAF mène à un changement de conformation de l'ADN (Fuchs and Daune, 1974; Fuchs et al., 1976). La guanine subit une rotation autour

de son lien glycosylique, provoquée par l'encombrement stérique du groupement acétyl de l'AAF. Dans cette configuration, appelée syn, le fluorène vient s'intercaler dans la double hélice (O'Handley et al., 1993). La guanine est alors rejetée à l'extérieur de l'hélice et l'appariement guanine:cytosine est rompue (Figure 69B). La cinétique de franchissement d'un adduit AAF par Pol η purifiée à partir de cellules humaines est beaucoup plus lente que celle d'une lésion CPD (Masutani et al., 2000).

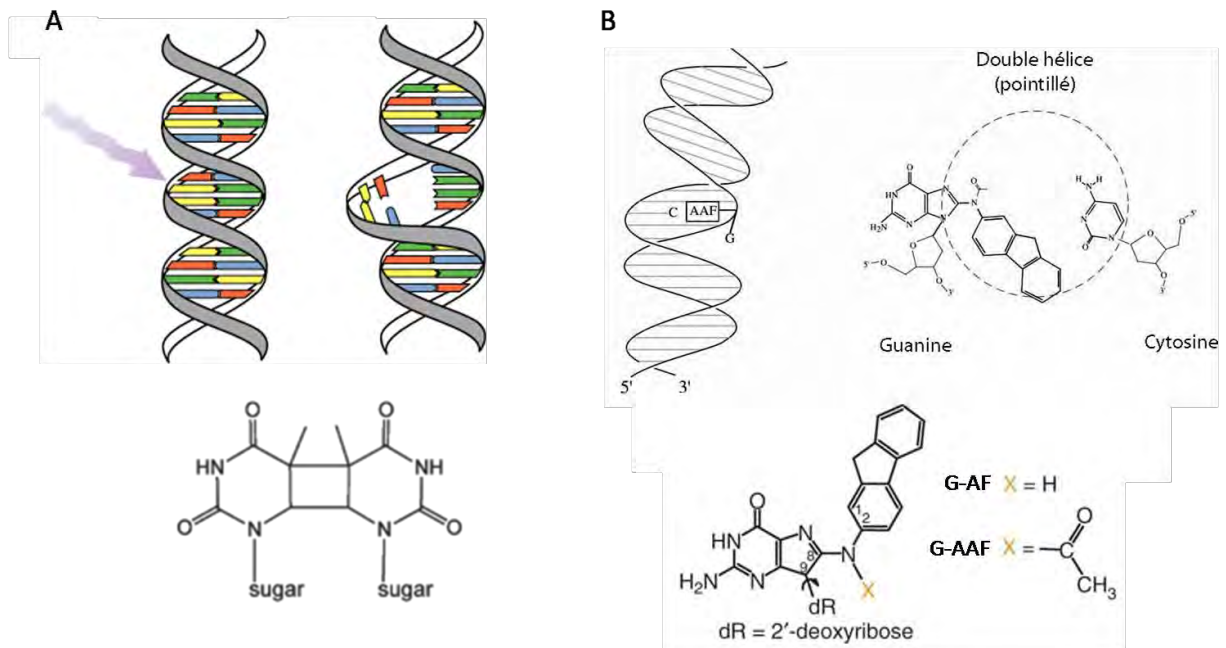


Figure 69: Perturbation de la structure de l'ADN par la formation d'un dimère de pyrimidine ou par l'adduit AAF et structure d'un dimère de pyrimidine de type cyclobutane (CPD) (A) et du G-AAF (B). A. Les ultraviolets stimulent la formation d'un cyclobutane entre deux thymines (en jaune) adjacentes du même brin d'ADN. B. Le N-2 acétylamino-fluorène forme avec la guanine le N-(deoxyguanosine-8-yl)-2-acétylamino-fluorène (G-AAF), ce qui induit une perturbation locale de l'ADN par le rejet de la guanine en dehors de la double hélice d'ADN. Le N-2 acétylamino-fluorène réagit avec le carbone 8 de la guanine, menant à la formation de deux types de lésions, l'une sans groupement acétyl (G-AF) et l'autre portant un groupement acétyl (G-AAF). Wikipedia.fr et issu de la thèse de Jean-Baptiste Duvauchelle.

Il a été montré que la mono-ubiquitination de PCNA stimule l'activité de Pol η *in vitro* pour le franchissement d'un site abasique (Garg et al., 2005). Dans le cas d'une lésion AAF, la modification de PCNA pourrait avoir le même effet, tandis que Pol η n'aurait pas besoin d'une lésion forte avec PCNA par l'intermédiaire de l'ubiquitine pour franchir efficacement les CPD. L'Ub-PCNA pourrait aussi recruter des **co-facteurs additionnels** qui faciliteraient le franchissement de l'AAF par Pol η . **Rad18** en elle-même pourrait être requise pour la TLS de cette lésion. En effet Watanabe et al ont montré que l'interaction de Rad18 avec Pol η est importante pour la fonction de la polymérase *in vivo* (Watanabe et al., 2004).

C. Contributions des domaines PIP et UBZ de Pol η pour son activité *in vivo*

Dans un deuxième temps, la lignée cellulaire XP30RO, déficiente pour Pol η a été utilisée pour générer différents clones exprimant de manière stable Pol η dans sa version sauvage ou portant différentes mutations: un mutant délété de son domaine de liaison à PCNA PIP2 (Δ PIP); un mutant où le résidu **D652** est muté en alanine et ne peut plus interagir avec l'ubiquitine (DA)(Bienko et al 2005); enfin un double-mutant DA- Δ PIP (Figure 70).

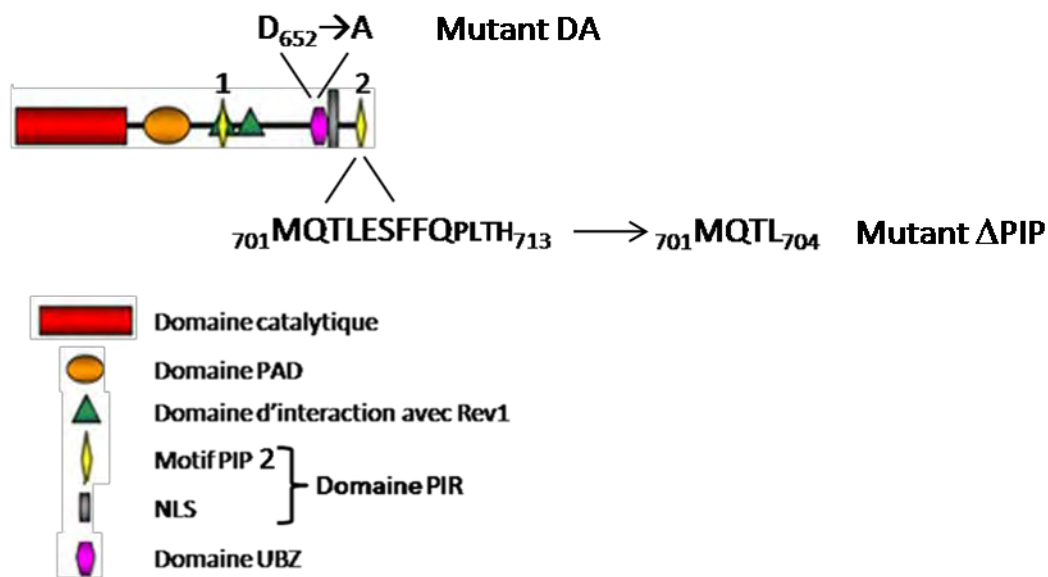


Figure 70: Les mutations D₆₅₂A et Δ PIP dans Pol η . La mutation D₆₅₂A est située dans le domaine UBZ. Dans le mutant Δ PIP, la protéine est délétée de ses 9 derniers acides aminés, dont 5 appartiennent au motif PIP2. Adapté de Guo et al 2009.

Nous avons examiné, à l'aide de ces différentes lignées, la **contribution de chaque domaine pour compléter la sensibilité aux UV des XP30RO**.

Nous avons analysé la sensibilité aux UV de 3 clones Δ PIP exprimant 5 à 20 fois plus Pol η que la lignée contrôle MRC5. Le clone Δ PIP5, malgré une expression cinq fois supérieure au niveau physiologique, échoue clairement à compléter efficacement la sensibilité des cellules XP30RO (Figure 71), ce qui montre **la nécessité d'un domaine d'interaction avec PCNA intact**.

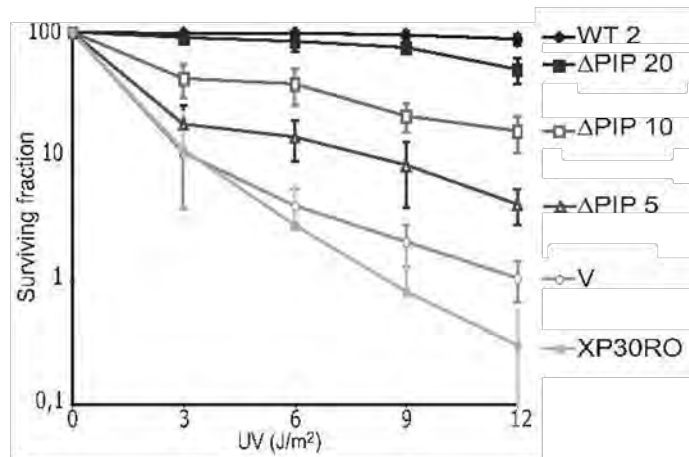


Figure 71: Courbes de survie aux UV des cellules XP30RO exprimant Pol η dans sa version sauvage (WT) ou délétée pour le domaine PIP (Δ PIP). Les numéros indiquent le niveau de surexpression de la protéine par rapport à la lignée contrôle MRC5.

Cependant, nous observons que le niveau d'expression a clairement un effet positif sur la restauration de la sensibilité aux UV. Le **deuxième PIP** récemment découvert (Acharya et al., 2008) **pourrait se substituer** dans une certaine mesure au premier, avec une efficacité moindre. Encore plus récemment, il a été mis en évidence que le **motif NLS** de Pol η contribue à l'interaction avec PCNA autant que le motif PIP (Bienko et al., 2010). **Les deux domaines PIP et le motif NLS sont chacun nécessaires pour que Pol η soit parfaitement active** (Figure 70; Figure 71).

Le **domaine UBZ pourrait aussi remplacer le domaine PIP** dans son interaction avec PCNA grâce à la liaison avec l'ubiquitine de Ub-PCNA. Cependant, de récentes études ont montré que le motif PIP contribue de manière plus significative à l'interaction entre Pol η et PCNA que le domaine UBZ (Bomar et al., 2007; Hishiki et al., 2009). Enfin, l'interaction avec d'autres protéines comme Rev1 ou Rad18 pourrait aussi être à l'origine d'une compensation de l'absence du domaine PIP (Watanabe et al., 2004; Yuasa et al., 2006).

Nous avons de la même manière analysé la sensibilité aux UV de trois clones DA, exprimant de 1 à 10 fois plus Pol η que les cellules MRC5. Avec une expression équivalente au niveau physiologique, **le mutant DA ne peut que partiellement compléter la sensibilité aux UV des XP30RO** (Figure 72). De manière surprenante, contrairement aux mutants Δ PIP, la **surproduction de Pol η DA a très peu d'impact sur la complémentation de la sensibilité aux UV**. Enfin, le double-mutant DA- Δ PIP est plus sensible aux UV que les deux simple-mutants, et ce, malgré une expression vingt fois supérieure au niveau physiologique. Ceci indique que **le résidu D652 est nécessaire pour une fonction qui ne peut être compensée par PIP, ou un autre domaine de Pol η** , puisque la surexpression du mutant DA n'a pas d'impact sur la survie.

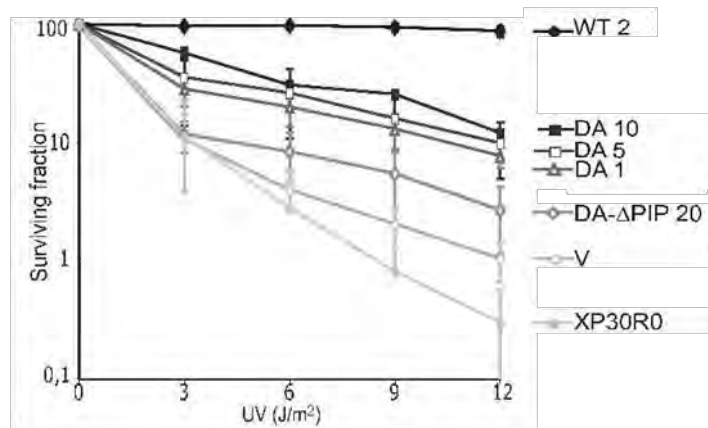


Figure 72: Courbes de survie aux UV des cellules XP30RO exprimant Pol η dans sa version sauvage (WT), portant une mutation du résidu D652 en alanine ou déléetée et mutée (DA- Δ PIP) . Les numéros indiquent le niveau de surexpression de la protéine par rapport à la lignée contrôle MRC5.

D. Les deux domaines PIP et UBZ contribuent au franchissement des lésions TT-CPD et G-AAF *in vitro*

Pour analyser la contribution des deux domaines PIP et UBZ de Pol η dans la TLS, nous avons préparé des extraits cellulaires issus des différents clones cités précédemment et nous avons analysé l'efficacité de TLS *in vitro* de chacun de ces clones.

Quelle que soit la lésion, les deux mutations ont un impact sur l'efficacité de TLS *in vitro* (Figure 73). Nos données sont donc parfaitement en accord avec le modèle selon lequel les deux régions contribuent à la fonction de Pol η (Bienko et al., 2005; Acharya et al., 2007; Parker et al., 2007; Acharya et al., 2008). Le fait que la TLS dans les extraits soit dépendante du motif PIP de Pol η confirme que **PCNA est impliqué dans la réaction** (au moins en partie en ce qui concerne le franchissement des TT-CPD) (Figure 73).

Les deux domaines sont impliqués dans le franchissement des TT-CPD dans les extraits Δ PIP5 et DA1, l'efficacité de TLS chutant d'environ 50% (Figure 73). Nous avons montré que Rad18 et par conséquent la mono-ubiquitination de PCNA ne sont pas nécessaires dans la cas d'une lésion CPD. Pour le franchissement de cette lésion, le domaine UBZ de Pol η pourrait se lier à l'ubiquitine d'une protéine, qui serait ubiquitinée par une ligase autre que Rad18. Une autre possibilité serait que **la mutation D652A entraîne aussi la perte d'une fonction inconnue, distincte de celle de lier l'ubiquitine**. Acharya et al., en étudiant différents mutants du domaine UBZ de Pol η , montrent que la perte de la capacité de lier l'ubiquitine n'a pas d'effet sur la sensibilité aux UV ou sur la mutagenèse (Acharya et al., 2007; Acharya et al. 2008).

Le domaine PIP et le résidu D652A sont chacun essentiels pour le franchissement du G-AAF (Figure 73). Pour cette lésion, les liaisons avec PCNA grâce à PIP et avec l'ubiquitine grâce à UBZ sont absolument essentielles pour que Pol η soit active. Ce résultat est en accord avec la dépendance en Rad18 observée précédemment pour le franchissement de cette lésion.

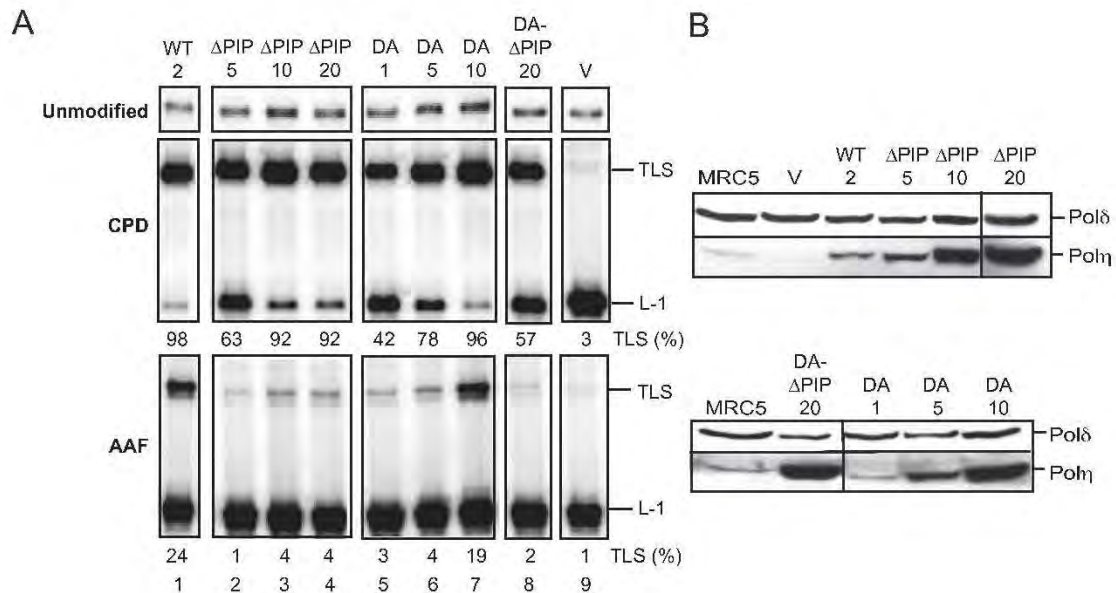


Figure 73: Contribution relative des domaines PIP et UBZ de Pol η pour le franchissement des lésions TT-CPD et G-AAF *in vitro*. **A.** Les produits de l'élongation de l'amorce radio-marquée obtenu après 20 minutes d'incubation avec 30 μ g d'extraits et les ADN simple-brin pUC118, pUC-CPD et pUCG1-AAF sont analysés par électrophorèse en gel dénaturant. **B.** La quantité de protéine Pol η dans les différents extraits cellulaires est analysée par Western Blot à l'aide d'un anticorps dirigé contre Pol η .

3. Conclusion et perspectives

En dépit de nombreuses avancées dans la connaissance du processus de synthèse translésionnelle, le mécanisme par lequel les polymérases translésionnelles accèdent à la machinerie répliquative bloquée par une lésion reste incertain. De nombreuses données indiquent que **des modifications post-répliquatives de Pol η** (phosphorylation, mono-ubiquitination) (Bienko et al., 2005; Chen et al., 2008; Bienko et al., 2010) ainsi que **des interactions avec différentes protéines** (PCNA, Rev1, Rad18) (Tissier et al., 2004 ; Ohashi et al., 2004 ; Guo et al., 2003; Watanabe et al., 2004) **sont impliquées dans son recrutement**. De plus, Pol η ne contribue pas seulement à combler les brèches d'ADN simple-brin lorsque la réplication a redémarré en aval d'une lésion ("gap-filling"), mais est aussi requise pour le maintien d'une progression normale de la réplication après que l'ADN ait été endommagé. Ainsi, dans les cellules déficientes en Pol η , non seulement des produits de réplication de taille réduite s'accumulent après une irradiation aux UV mais l'élongation de ces intermédiaires est très retardée (Lehmann et al., 1975; Edmunds et al., 2008).

Au vu de nos résultats, nous proposons que, **suivant la nature de la lésion, différents mécanismes contrôlent l'activité de Pol η** . **Certaines lésions ne nécessitant pas la mono-ubiquitination de PCNA par Rad18**, comme les TT-CPD, **pourraient être efficacement franchies au cours de la synthèse processive de l'ADN**, sans découplage entre l'activité de l'hélicase et de la polymérase répliquative. Nos données montrent clairement qu'en l'absence de Rad18, Pol η franchit aisément les TT-CPD en interagissant avec PCNA (Figure 74 voie A). **Si cette TLS échoue, le découplage a alors lieu, menant à la formation d'ADN simple-brin recouvert de RPA et à la mono-ubiquitination de PCNA par le complexe Rad6/Rad18. Rad18 et Ub-PCNA pourraient alors faciliter l'activité de Pol η** , comme nous l'avons montré dans le cas d'une lésion G-AAF (Figure 74 voie B). Nous avons observé que les TT-CPD induisent la mono-ubiquitination de PCNA dans notre système, car les lésions sont localisées sur l'ADN simple-brin et donc peuvent stimuler la modification de PCNA par Rad6/Rad18.

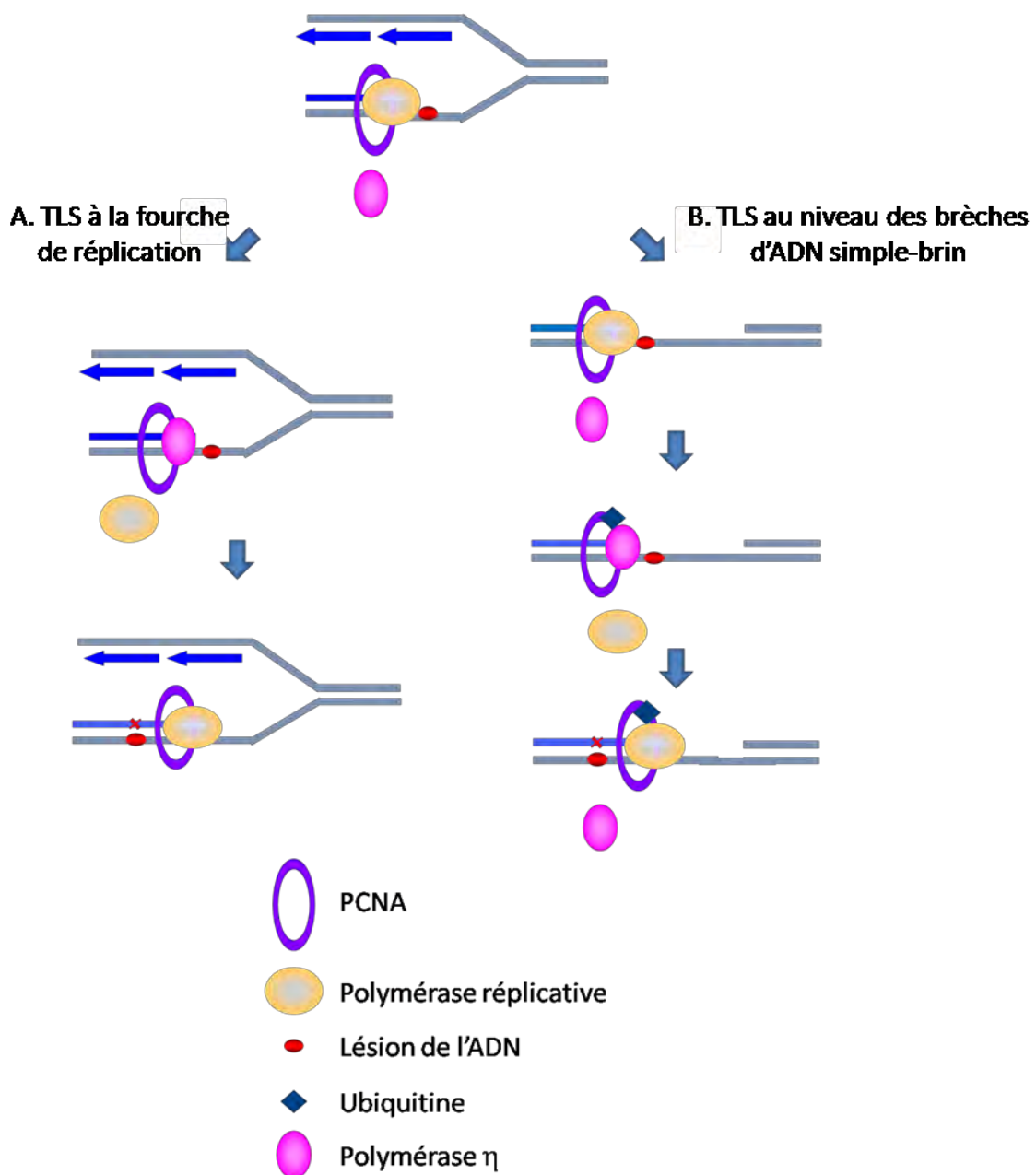


Figure 74: Modèles de synthèse translésionnelle. A. TLS au niveau d'une fourche de réplivation bloquée en coordination avec la synthèse de l'ADN, sans découplage des polymérases réplivatives. B. TLS au niveau d'une brèche d'ADN simple-brin.

Une étude a récemment montré que dans *S. cerevisiae*, l'expression de *RAD18*, *RAD30* (Pol ϵ) et *REV3* dans des cellules déficientes en chacune de ces trois protéines restaure la survie aux UV même lorsqu'elle est limitée à la phase G2 du cycle cellulaire. Ces données indiquent que la synthèse translésionnelle agit en dehors de la fourche de réplivation, au niveau des brèches d'ADN simple-brin (Karras and Jentsch, 2010). Cette étude ne montre cependant pas que la TLS ne pourrait pas avoir lieu en phase S au niveau d'une fourche de réplivation.

Nous avons établi que, dans des extraits cellulaires, **le franchissement des lésions G-AAF et TT-CPD nécessite le domaine UBZ de Pol η** . Ce domaine pourrait jouer un double

rôle lors du processus de TLS. D'une part, il serait nécessaire pour **la liaison avec Ub-PCNA durant la réaction de gap-filling.** D'autre part, le résidu D652 pourrait participer à **une autre fonction**, comme l'interaction avec une autre protéine nécessaire pour la coordination de l'activité Pol η à la fourche de réplication. En accord avec cette hypothèse, Edmunds et al ont montré que, dans les cellules DT40, la mono-ubiquitination de PCNA n'est pas nécessaire pour maintenir la progression de la fourche de réplication d'un ADN endommagé mais est requise de manière post-réplivative. De plus, ils montrent également que le domaine UBM de Rev1 est requis pour son activité à la fourche de réplication en l'absence de Ub-PCNA (Edmunds et al., 2008), confirmant que ce domaine pourrait jouer un rôle autre que l'interaction avec Ub-PCNA. **De plus amples études sont nécessaires, d'une part pour identifier ce deuxième rôle et d'autre part pour vérifier si un tel mécanisme pourrait s'appliquer aux polymérase de la famille Y en général.**

Les données présentées nous permettent de valider le test de TLS *in vitro* que nous utilisons. En effet, la TLS dans les extraits cellulaires est dépendante non seulement de PCNA et de l'activité de Pol η mai aussi de ses domaines PIP et UBZ. Ceci indique que, dans ce système, la TLS est un processus coordonné. Nous pouvons donc envisager d'utiliser ce test pour réaliser la **carte protéomique d'une réaction de TLS complète à l'aide d'un ADN simple-brin portant une lésion G-AAF ou TT-CPD en capturant les protéines impliquées** (cf perspectives de la première partie). Nous pourrions étudier le recrutement et le relargage des protéines impliquées ainsi que leurs modifications post-traductionnelles potentielles.

Ces études nous permettront de mieux définir les mécanismes moléculaires menant à l'échange de polymérase durant la synthèse translésionnelle et à sa régulation.

CONCLUSION GENERALE

La synthèse translésionnelle est un mécanisme complexe qui implique notamment la mono-ubiquitination de PCNA par le complexe Rad6/Rad18 (Hoeye et al., 2002; Stelter and Ulrich, 2003; Kannouche et al., 2004). Cependant, le signal qui induit cette modification et la fonction précise de celle-ci restent incertains. La mono-ubiquitination de PCNA pourrait représenter le signal de recrutement des ADN polymérases translésionnelles (Bienko et al., 2005; Guo et al., 2006. Plosky et al., 2006) et/ou favoriser le départ de certains facteurs protéiques inhibant la TLS (Acharya et al.,). De plus, suivant la nature de la lésion, la TLS pourrait nécessiter l'action de plusieurs polymérases translésionnelles et l'intervention de l'anneau 9-1-1 (Kai and Wang, 2003a; Sabbioneda et al., 2005; Jansen et al., 2007) et de Rev1 (Hirano et al., 2006; Murakumo et al., 2001; Guo et al., 2003, Ohashi et al., 2004; Tissier et al., 2004; D'Souza and Walker, 2006) en tant que plate-formes.

Dans ce contexte, le test de TLS *in vitro*, mis au point au laboratoire, présente l'**avantage** de mettre en œuvre des **mécanismes simplifiés** par rapport à ceux activés *in vivo* après traitement des cellules par des agents qui bloquent les ADN polymérases répliquatives (induction des points de contrôle du cycle cellulaire, de la transcription de gènes de la réparation ou de l'apoptose...).

Le fait que la TLS dans les extraits cellulaires nécessite l'intégrité des domaines PIP et UBZ de Pol η et la mono-ubiquitination de PCNA par Rad6/Rad18 nous permet d'envisager son utilisation pour décrypter le mécanisme moléculaire conduisant à la mono-ubiquitination de PCNA et les différentes étapes de la TLS. La combinaison de l'essai avec la capture des protéines spécifiquement impliquées dans le processus de TLS nous permettra de réaliser la **carte protéomique de la TLS dans les cellules humaines**. Différentes étapes de la réaction pourront être analysées, comme l'assemblage du réplisome, son blocage au niveau d'une lésion et l'activation du complexe Rad6/Rad18 et finalement le franchissement de la lésion. Nous pourrions identifier les protéines impliquées dans ces différentes étapes et analyser les éventuelles modifications post-traductionnelles.

Ce test présente aussi l'**originalité** de permettre **l'étude du franchissement d'une lésion donnée, grâce à l'utilisation de plasmides mono-modifiés**:

(1) L'analyse des complexes protéiques impliqués dans le franchissement d'une lésion TT-CPD nous permettra d'éclairer le **rôle du domaine UBZ dans ce cas particulier**. Nous allons tout d'abord vérifier que le franchissement de cette lésion est bien indépendant de la mono-ubiquitination de PCNA en complétant un extrait MRC5 Rad18^{KD} déplété pour PCNA avec du PCNA K164R. Si tel est le cas, le rôle du domaine UBZ pour le franchissement du TT-CPD est distinct de l'interaction avec Ub-PCNA. Ce domaine pourrait alors permettre

l'interaction de Pol η avec une autre protéine du réplisome. En effet, des expériences de double-hybride conduites au laboratoire ont montré que Pol η interagit avec la sous-unité p50 de Pol δ (données non publiées). Des études vont être effectuées pour déterminer si le domaine UBZ est impliqué. L'importance de cette liaison dans la TLS pourra aussi être étudiée.

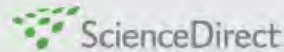
(2) Le franchissement de la lésion G-AAF nécessitant Rad18, la complémentation d'un extrait MRC5-Rad18^{KD} déplété pour PCNA avec du PCNA fusionné à l'ubiquitine nous permettra de vérifier que la mono-ubiquitination de PCNA est bien nécessaire (Collaboration en cours avec L. Haracska, Institute of Genetics, Biological Research Center, Hungarian Academy of Science, Hongrie). Si c'est bien le cas, nous envisageons **d'étudier le rôle de cette protéine et de sa modification au moment de l'échange des polymérases au niveau de la lésion**. En effet, nous ignorons si la même molécule de PCNA est impliquée durant tout le processus. Il est possible que l'arrêt de la polymérase répliquative entraîne le chargement et la mono-ubiquitination d'un nouveau PCNA. Une fois la lésion franchie, la dé-ubiquitination de PCNA ou le chargement d'une autre molécule de PCNA (non ubiquitiné) pourrait être nécessaire pour le retour de la polymérase répliquative. En effet, une étude a montré à l'aide de protéines de levures purifiées (Pol δ , Pol ϵ , PCNA, PCNA fusionné à l'ubiquitine en K164 et RFC) que l'échange entre Pol δ et Pol ϵ nécessitait l'arrêt de la polymérase répliquative (provoqué par l'absence d'un déoxynucléotide) et la mono-ubiquitination de PCNA. Dans ce système, le retour de Pol δ est inhibé en présence de PCNA mono-ubiquitiné (Zhuang et al., 2008). Des extraits pourraient être déplétés en PCNA puis complétés par des versions étiquetées et/ou mutées de PCNA (PCNA K164R, PCNA fusionné à de l'ubiquitine, portant des épitopes ou radioactif) au cours d'une cinétique. La capture des protéines nous permettra de voir quelle version de PCNA est préférentiellement capturée au cours de la réaction.

(3) Nous pouvons aussi envisager l'étude du franchissement **d'autres lésions plus complexes** comme les photo-produits T(6-4)T, qui pourrait nécessiter l'intervention d'autres protéines en complément de Pol η . Une étude *in vitro* montre que Pol η n'incorporerait qu'une guanine en face du premier T puis se dissocie de l'ADN (Zhang et al., 2000a). Selon les modèles proposés dans la littérature, Pol δ serait impliquée dans l'étape d'élongation (Zhang et al., 2000a; Shashar et al., 2009). L'étude du franchissement d'une telle lésion pourrait nous permettre de déterminer les protéines qui assurent l'étape d'élongation et leur modification post-traductionnelles éventuelles.

La réalisation de ces différents projets contribuera à la détermination de la cascade d'évènements qui régulent la TLS et conduisent à l'accomplissement de ce mécanisme dans les cellules humaines. Cette approche ouvrira ainsi de nouvelles voies d'exploration dans ce domaine.

ANNEXES

1. Article 1

available at www.sciencedirect.comjournal homepage: www.elsevier.com/locate/dnarepair

Requirements for PCNA monoubiquitination in human cell-free extracts

Valérie Schmutz^a, Jérôme Wagner^a, Régine Janel-Bintz^a,
Robert P.P. Fuchs^b, Agnès M. Cordonnier^{a,*}

^a Institut Gilbert Laustriat, Biomolécules, Biotechnologie, Innovations thérapeutiques, UMR 7175 - LC1 - CNRS/ULP, ESBS, Bld Sébastien Brandt, BP 10413, Illkirch 67412, France

^b Genome Instability and Carcinogenesis, CNRS FRE 2931, Chemin Joseph Aiguier, 13402 Marseille cedex 20, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 27 April 2007

Received in revised form

11 June 2007

Accepted 13 June 2007

Keywords:

PCNA

Monoubiquitination

Human cell-free extract

Rad6/Rad18

ABSTRACT

The Rad6/Rad18-dependent monoubiquitination of PCNA plays a crucial role in regulating replication past DNA damage in eukaryotic cells. We show here that in human cell-free extracts, efficient PCNA monoubiquitination requires both the synthesis of relatively long DNA tracts and polymerase idling or stalling at sites of DNA modification or DNA secondary structures. This dual dependency suggests a dynamic process in which, following initiation, the DNA synthesizing complex undergoes modifications that make it competent as a mediator for the activation of the Rad6/Rad18 pathway.

© 2007 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) was identified as an essential factor for both the processivity of the replicative DNA polymerase complex, and the correct coordination of the leading and lagging strand synthesis [1]. PCNA is a homotrimeric ring-shaped protein complex that is loaded onto a primed template DNA containing a 3'OH recessed terminus by the replication factor C, RFC [2]. Once loaded, PCNA encircles double-stranded DNA and acts as a sliding clamp that tethers its binding partners to DNA [3]. PCNA is known to interact with numerous proteins involved in different DNA transactions [4]. How these multiple partners bind PCNA in a coordinate manner to perform their functions in DNA replication and repair, remains an open question.

In several organisms, PCNA has been shown to be monoubiquitinated by Rad6/Rad18 complex in response to various DNA damaging agents that block the replication forks [5–9]. Genetic epistasis analyses conducted in *S. cerevisiae* show that monoubiquitinated PCNA (Ub-PCNA) is involved in the same pathway as the translesional DNA polymerases pol η and pol ζ [5,10,11]. In addition, the interaction between Ub-PCNA and translesional DNA polymerases promotes lesion bypass in mammalian cells [12,13,14]. Altogether these observations point to a role of PCNA monoubiquitination in the regulation of the switch between replicative and specialized DNA polymerases during translesion synthesis. However, the molecular events that trigger PCNA monoubiquitination as well as the exact role of Ub-PCNA in the TLS process remain elusive. The current consensus suggests that the single-stranded binding

* Corresponding author. Tel.: +33 3 90 24 46 93; fax: +33 3 90 24 46 86.

E-mail address: cordonnier@esbs.u-strasbg.fr (A.M. Cordonnier).
1568-7864/\$ – see front matter © 2007 Elsevier B.V. All rights reserved.
doi:10.1016/j.dnarep.2007.06.003

protein Rad18, together with its partner Rad6, could be targeted to the lesion/blockage site by means of single-stranded DNA regions accumulating downstream of replication blocks. Accordingly, PCNA monoubiquitination requires uncoupling of DNA polymerase and helicase activities in *Xenopus laevis* egg extracts [9]. This model is also supported by *in vitro* studies showing that monoubiquitination of yeast PCNA by purified Rad6 and Rad18 proteins, requires only the presence of primed ssDNA, replication protein A and the clamp loader RFC [15,16]. Here, we show that in human cell-free extracts the situation is more complex as primed ssDNA is shown not to be sufficient to trigger PCNA monoubiquitination. More precisely, efficient PCNA modification depends both on DNA synthesis of relatively long polymerization tracts and upon the presence of pausing sites or replication arrests. These data suggest that the replication apparatus plays an active role in the activation of the Rad6/Rad18 pathway.

2. Materials and methods

2.1. Cell cultures and preparation of whole-cell extracts

Normal (MRC5) or *Xeroderma pigmentosum* variant (XP30RO). SV40-transformed fibroblastic cells and HeLa cells were grown at 37 °C in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 10% fetal calf serum and gentamicin (0.5 mg/ml). Whole-cell extracts were prepared as described previously [17].

2.2. DNA substrates

Construction of the single-stranded plasmid with a unique AAF adduct, pUC3G1.ss has been extensively described previously [18].

The oligonucleotide sequences of the primers are: #1) 5'-CGACGGCCAGTGGCAAGCTTAGTC-3', #2) 5'-CGACGTTGTAAAACGACGGCCAGT-3', #3) 5'-CCAGGGTTTTCCAGTCACGACGT-3', #4) 5'-TGTGCTGCAAGGCGATTAAGTTGG-3' and #5) 5'-ACGGGAAAGCGCGCAACGTGGC-3'.

2.3. *In vitro* PCNA ubiquitination assay and primer extension analysis

Standard PCNA ubiquitination assays and primer extension analysis were performed in the conditions described previously [17] by using 30 µg of cell extract and 10 fmol of the pUC118.ss DNA annealed with primer n°4, unless otherwise indicated.

2.4. Nickel pull-down experiments and immunoblot analysis

Reaction mixtures were adjusted to 20 mM imidazole and incubated with Ni-NTA magnetic agarose beads (Quiagen) for 1 h at 4 °C. Beads were washed four times with buffer containing 20 mM imidazole. The bound proteins were extracted from the beads by heating in SDS-PAGE sample buffer. For immunoblot analysis, samples were electrophoresed through a 12% SDS-PAGE, transferred to PVDF membrane (Biorad) and

the blots were probed with mouse monoclonal anti-PCNA antibody (PC10, Santa Cruz Biotechnology).

3. Results and discussion

3.1. PCNA monoubiquitination in cell-free extracts requires primer extension

To investigate the requirements for PCNA ubiquitination in the context of a DNA undergoing replication, a primed (or unprimed) circular ssDNA substrate (pUC118.ss) was incubated with a whole-cell extract prepared from transformed MRC5 human fibroblasts, in the absence or presence of all four dNTP. After 20 min incubation at 37 °C, the samples were subjected to immunoblotting analysis with an antibody raised against PCNA. In the reaction sample containing both primed ssDNA and all four dNTP, a band migrating at the size expected for native PCNA (theoretical MW of 28.8 kDa, migrates as 35 kDa species) and an additional PCNA-immunoreactive band of higher molecular weight (44 kDa) were detected (Fig. 1A, lane 4), indicating that PCNA undergoes post-translational modification during the reaction. We observed that unprimed ssDNA could not trigger efficient PCNA modification (Fig. 1A, lanes 1 and 2), suggesting that PCNA must be loaded onto DNA to be modified. Interestingly, while the absence of dNTP should not affect the RFC dependent loading of PCNA onto primed DNA, no modification of PCNA was detected in the presence of primed ssDNA unless dNTP were included in the reaction (Fig. 1A, lanes 3 and 4) indicating that DNA synthesis is required to trigger the modification. The faint band of 44 kDa observed in the absence of primed ssDNA but in the presence of dNTP (Fig. 1A, lane 2), suggests that some background of DNA synthesis may occur in cell-free extracts.

To determine if the band of 44 kDa in Fig. 1A represents the monoubiquitinated form of PCNA, we prepared a crude extract from MRC5 cells that were transfected with a plasmid encoding a histidine (His)-tagged ubiquitin. After 30 min of primer extension in the cell extract, His-tagged ubiquitin conjugates were purified on nickel magnetic beads and probed for PCNA. No protein was present in the pull-down fraction from an untransfected cell extract, while two PCNA-reactive bands migrating at the size expected for non-modified and mono-His-ubiquitinated PCNA were detected when using transfected cell extracts (Fig. 1B). This result confirms that the major modification of PCNA we observed is monoubiquitination. In addition, the presence of the non-modified form of PCNA in the pull-down fraction shows that, under the conditions used here, not all of the monomers of the trimeric PCNA clamp undergo monoubiquitination.

In order to ascertain whether PCNA monoubiquitination is dependent on Rad18 protein, vectors expressing either a wild type or a dominant-negative mutant (C28F) hemagglutinin-tagged Rad18 [19] were transfected into HeLa cells, and PCNA ubiquitination was analyzed in both cell extracts. We found that transient expression of Rad18 increased the level of Ub-PCNA while it is significantly reduced when the mutated form (C28F) of Rad18 is expressed (data not shown).

Titration experiments revealed that monoubiquitination of PCNA is template dose-dependent (Fig. 1C). Quantitative

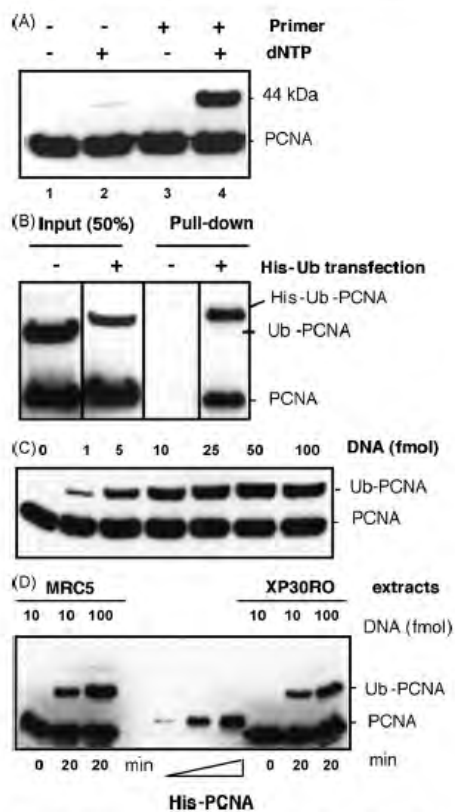


Fig. 1 – Immunoblot analysis of PCNA modification in cell-free extract. (A) A MRC5 cell extract was incubated for 20 min at 37 °C in the presence of 10 fmol of unprimed or primed ssDNA. The four dNTP (200 μM) are included in the reaction as indicated. (B) A MRC5 cell extract prepared 48 h after transfection with a vector expressing His-ubiquitin-pMT107 [24] was incubated 30 min at 37 °C in the presence of 100 fmol of DNA substrate. Immunoblot using anti-PCNA antibody was performed on either whole-cell extract (input) or after purification on nickel beads (pull-down). (C and D) Standard assays with increasing amounts of primed ssDNA and MRC5 (C) or XP30RO cell extracts were carried out at 37 °C. Samples containing 15 fmol, 60 fmol or 120 fmol of His-PCNA monomers were run on parallel.

immunoblot analysis using a range of purified PCNA as standard, allowed us to estimate that the amount of Ub-PCNA formed in both MRC5 and XP30RO extracts was in excess compared to the amount of primer/template junctions included in the reaction (Fig. 1D). Unexpectedly, within 20 min incubation in these extracts, up to 60 fmol of PCNA monomer became monoubiquitinated in the presence of 10 fmol of primed ssDNA (of which only a small fraction is elongated, see Fig. 2). Since only PCNA encircling the DNA is sub-

ject to monoubiquitination, and given that not all of the monomers are monoubiquitinated at the same time (Fig. 1B), the observed Ub-PCNA/template molar excess suggests that multiple rounds of PCNA loading and ubiquitination must occur during the incubation time.

Overall, these results demonstrate that PCNA undergoes monoubiquitination in cell-free extracts in a Rad18-dependent manner. In agreement with previously described *in vitro* systems [15,16], we report here that unprimed ssDNA is a poor effector for PCNA ubiquitination. Surprisingly, in cell-free extracts, both primer and dNTP are absolutely required for monoubiquitination of PCNA, suggesting that DNA synthesis is an obligatory step to induce PCNA monoubiquitination and that the single-stranded DNA “per se” is not the signal that activates the Rad6/Rad18 pathway. Chang et al. [9] recently observed that incubating unprimed ssM13DNA in *Xenopus* egg extracts in the presence of dNTP induces PCNA modification. However, the unambiguous requirement for replication is difficult to address in this system given that dNTP are necessary for primer synthesis by DNA polymerase α and that primed ssDNA could trigger PCNA modification *in vitro* [15,16].

3.2. Monoubiquitination of PCNA is coupled to the transient pausing of a processive replication complex

In order to get further insights into the mechanisms underlying PCNA monoubiquitination in cell-free extracts, primer extension assays using primed pUC118.ss (as above) and immuno-detection of PCNA monoubiquitination were performed in parallel. Analysis of the DNA elongation products by PAGE shows that processive DNA synthesis rapidly extends the 24 nucleotide-primer up to a DNA fragment of about 156 nucleotides (Fig. 2A, left panel). This replication intermediate likely results from transient pausing of the DNA polymerase at a stable secondary structure present in the template. Longer incubation times allow replication to progress through this structural block, as shown by the decline of the intensity of the signal corresponding to the 156 nucleotides fragment and the concomitant appearance of additional, more distal, pausing sites on the template. Western blot analysis performed on duplicate samples shows that Ub-PCNA appeared as early as 2 min after addition of the DNA substrate to the extract and reached a plateau around 30 min (Fig. 2B, left panel).

We observed that there is a strong correlation between the amount of Ub-PCNA produced (Fig. 2B, left panel) and the rate of appearance of replication blocks (Fig. 2A, left panel) suggesting that the arrest of a processive replication complex is the trigger for PCNA modification. To test this hypothesis, *Escherichia coli* single-stranded DNA binding protein (SSB), known to remove secondary structures from single-stranded DNA, was added to the reaction at a DNA/SSB ratio 1:5 (w/w). Control experiments were conducted establishing that, under these conditions, the global level of DNA synthesis is not affected and that SSB does not inhibit directly PCNA ubiquitination (Fig. 2, C). Addition of SSB results in a partial removal of the pausing sites (Fig. 2A, middle panel) and concomitant reduction of the level of Ub-PCNA. These results strongly suggest that, in the absence of DNA damage, the stalling of the replication complex at the hairpin triggers PCNA modification during DNA synthesis in cell-free extracts. This is reminiscent

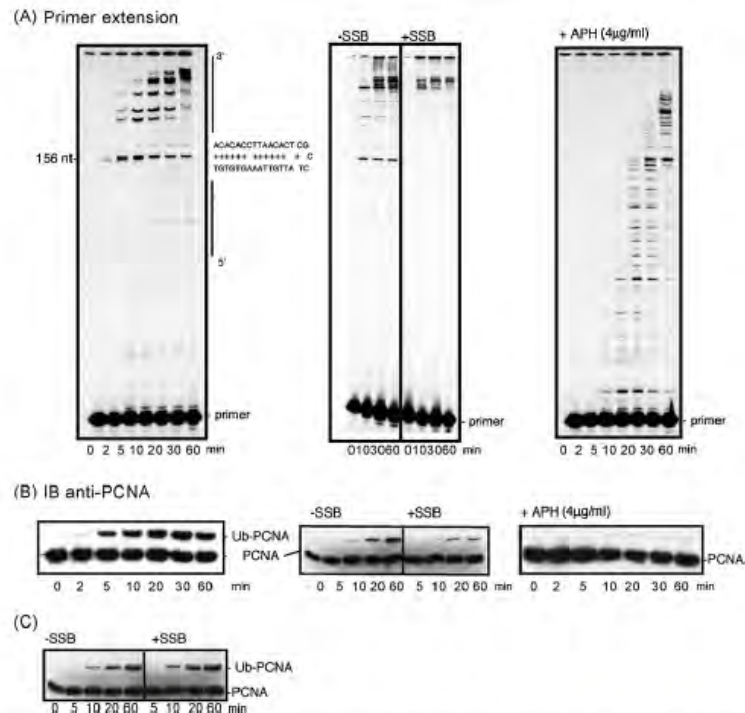


Fig. 2 – Monoubiquitination of PCNA is coupled to the transient pausing of a processive replication complex. DNA synthesis reactions in a MRC5 cell extract were carried out by using the pUC118.ss DNA (10 fmol in left and right panels, 12 fmol in middle panel) annealed to ^{32}P -labeled primer n°4 and in the presence of 40 μM dNTP. The products were analyzed by electrophoresis through a 7 M urea/8% polyacrylamide gel (A) and subjected to immunoblotting (IB) with anti-PCNA antibody (B and C). Reactions without and with SSB were conducted in the presence of 3 fmol of primed ssDNA plus 9 fmol of unprimed ssDNA (middle panels A and B) or 12 fmol primed ssDNA (panel C), in order to keep DNA/SSB ratio to 1:5 (w/w).

of the observation that a fraction of PCNA is monoubiquitinated during S phase in undamaged *S. pombe* cells [8], leading the authors to conclude that the modification results from spontaneous stalling of ongoing replication forks at natural pausing sites. Ub-PCNA was also observed in undamaged human cells provided that the deubiquitinase Usp1, which removes monoubiquitin from PCNA, is inactivated [20].

The effect of aphidicolin, a potent inhibitor of eukaryotic replicative DNA polymerases was also investigated. The drug was added to the reaction mixture at the same time than the cellular extract in order to inhibit DNA synthesis at the beginning of the primer extension reaction. Fig. 2 (A, right panel) shows that in the presence of aphidicolin, DNA synthesis proceeds in a distributive manner with numerous early replication stops. This defect is partially suppressed by increasing the concentration of dNTP (data not shown), consistent with previous observations obtained with purified DNA polymerases [21]. The level of PCNA monoubiquitination is drastically reduced in the presence of aphidicolin and 40 μM dNTP (Fig. 2B, right panel) and was less affected when the dNTP concentration was raised to 1 mM (data not shown). Thus, aphidicolin does not exert its inhibitory effect on PCNA

modification directly, but rather through alteration of the replication complex.

Aphidicolin induces numerous DNA polymerase pausing or dissociation events while monoubiquitination of PCNA could not be detected, suggesting that polymerization arrest "per se" is not sufficient to trigger PCNA monoubiquitination. Conversely, in the absence of aphidicolin, the stalling of the replication complex at the hairpin sites after processive DNA synthesis appears to be critical to trigger PCNA monoubiquitination. Overall, these data suggest that PCNA monoubiquitination in cellular extracts requires the arrest of a fully active replication complex.

3.3. The level of PCNA monoubiquitination increases with the length of the polymerization tracts

Results described above establish that replicating ssDNA is required to induce PCNA monoubiquitination in cell-free extracts. In order to determine unequivocally whether the extent of DNA synthesis could influence the efficiency of the reaction, we used different combinations of dNTP allowing the synthesis of DNA fragments of defined lengths. For

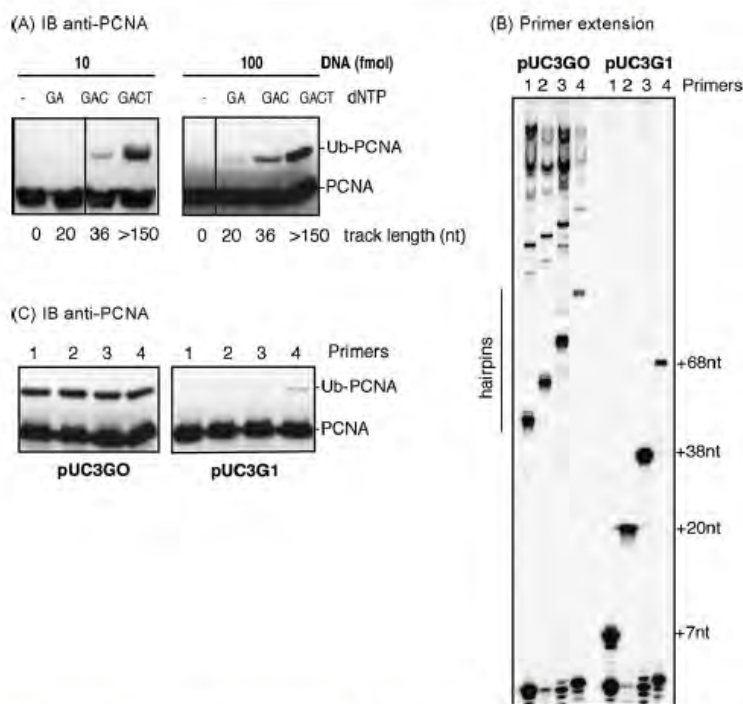


Fig. 3 – The level of PCNA monoubiquitination increases with the length of the polymerization tract. (A) pUC118.ss DNA annealed to primer n°5 was incubated in a MRC5 cell extract (30 μ g) for 20 min at 37 °C, in the absence or the presence of the indicated dNTP (200 μ M). (B and C) A XP30RO cell extract (30 μ g) was incubated 10 min at 37 °C with 10 fmol of the primed pUC3G0.ss or pUC3G1.ss substrates annealed with four different primers (n°1 to 4) located at different positions relative to the AAF adduct site. The products were analyzed by electrophoresis through a 7 M urea/8% polyacrylamide gel (B) and duplicate samples were subjected to immunoblotting with anti-PCNA antibody (C). The lengths of the polymerization tracts are indicated.

both concentrations of DNA template tested, the amount of Ub-PCNA detected is higher the longer the synthesis tract is (Fig. 3A, compare lane GA and GAC). This suggests that, under these particular conditions, the efficiency of PCNA monoubiquitination correlates with the length of the polymerisation tract. To further test this hypothesis, we took advantage on the fact that the *N*-2-acetylaminofluorene (AAF) adduct to guanine represents a severe block to DNA synthesis in *Xeroderma pigmentosum* variant (XP30RO) cell extracts [17]. Indeed, incubation of XP30RO cell extracts with a monomodified single-stranded template (pUC3G1.ss) annealed to primers located at different positions relative to the lesion site produced DNA fragments of various lengths corresponding to elongated products blocked one nucleotide before the AAF adduct (Fig. 3B). PCNA modification was reproducibly detected when the most distant primer relative to the lesion site was used (Fig. 3C, primer 4), while it was barely detectable in the presence of the other primers (Fig. 3C, primers 1, 2 and 3). One can notice that PCNA monoubiquitination appears to be less efficient when the adducted substrate was used (Fig. 3B, pUC3G1) rather than the non-modified one (Fig. 3B, pUC3G0), which seems a priori paradoxical and different from the in

vivo situation. In the assay described here, several hairpin sites represent numerous obstacles to the elongation reaction along the template DNA, leading to higher amounts of Ub-PCNA than if only a single obstacle (like an AAF lesion in XPV extracts) is encountered. Our hypothesis is that accumulation of Ub-PCNA presumably results from multiple cycles of ubiquitination following reloading of PCNA at each hairpin site.

Overall, these findings show that the efficiency of PCNA monoubiquitination is improved when pausing occurs after relatively long synthesis tracts. While ssDNA templates used here are quite different from a "real" replication fork, this might in turn reflect the dynamic process of the subunits assembly of the DNA replication complex, the composition of which may change between the initial and later stages of primer elongation. A "mature" conformation could be necessary to mediate the Rad6/Rad18 response after stalling of the complex due to either the lack of one nucleotide, the presence of an AAF adduct or a transient secondary structure. This idea is consistent with recent observations showing that PCNA fails to be monoubiquitinated in a *S. cerevisiae* strain lacking a subunit of pol δ (pol32 mutant) [22]. Alternatively, it

has been shown that PCNA is phosphorylated on Tyr 211 during cell proliferation [23] and this may be a prerequisite for further modification by Rad18. The assay described here provides a useful tool to address these questions, allowing the detailed analysis of the modifications of the different replisome components when they encounter a pausing site or a lesion.

Acknowledgements

We thank I. Tappin for the His-PCNA and M. Bichara and A. Tissier for helpful discussions and comments on the manuscript. This work was supported by the Ligue Régionale contre le Cancer and INCA grant n°P028.

REFERENCES

- [1] G. Prelich, B. Stillman, Coordinated leading and lagging strand synthesis during SV40 DNA replication in vitro requires PCNA, *Cell* 53 (1988) 117–126.
- [2] T. Tsurimoto, B. Stillman, Replication factors required for SV40 DNA replication in vitro. I. DNA structure-specific recognition of a primer-template junction by eukaryotic DNA polymerases and their accessory proteins, *J. Biol. Chem.* 266 (1991) 1950–1960.
- [3] P.M. Burgers, *Saccharomyces cerevisiae* replication factor C. II. Formation and activity of complexes with the proliferating cell nuclear antigen and with DNA polymerases delta and epsilon, *J. Biol. Chem.* 266 (1991) 22698–22706.
- [4] G. Maga, U. Hubscher, Proliferating cell nuclear antigen (PCNA): a dancer with many partners, *J. Cell. Sci.* 116 (2003) 3051–3060.
- [5] C. Hoege, B. Pfander, G.L. Moldovan, G. Pyrowolakis, S. Jentsch, RAD6-dependent DNA repair is linked to modification of PCNA by ubiquitin and SUMO, *Nature* 419 (2002) 135–141.
- [6] P.L. Kannouche, J. Wing, A.R. Lehmann, Interaction of human DNA polymerase eta with monoubiquitinated PCNA: a possible mechanism for the polymerase switch in response to DNA damage, *Mol. Cell.* 14 (2004) 491–500.
- [7] K. Watanabe, S. Tateishi, M. Kawasuji, T. Tsurimoto, H. Inoue, M. Yamaizumi, Rad18 guides poleta to replication stalling sites through physical interaction and PCNA monoubiquitination, *EMBO J.* 23 (2004) 3886–3896.
- [8] J. Frampton, A. Irmisch, C.M. Green, A. Neiss, M. Trickey, H.D. Ulrich, K. Furuya, F.Z. Watts, A.M. Carr, A.R. Lehmann, Postreplication repair and PCNA modification in *Schizosaccharomyces pombe*, *Mol. Biol. Cell.* 17 (2006) 2976–2985.
- [9] D.J. Chang, P.J. Lupardus, K.A. Cimprich, Monoubiquitination of proliferating cell nuclear antigen induced by stalled replication requires uncoupling of DNA polymerase and mini-chromosome maintenance helicase activities, *J. Biol. Chem.* 281 (2006) 32081–32088.
- [10] P. Stelter, H.D. Ulrich, Control of spontaneous and damage-induced mutagenesis by SUMO and ubiquitin conjugation, *Nature* 425 (2003) 188–191.
- [11] L. Haracska, C.A. Torres-Ramos, R.E. Johnson, S. Prakash, L. Prakash, Opposing effects of ubiquitin conjugation and SUMO modification of PCNA on replicational bypass of DNA lesions in *Saccharomyces cerevisiae*, *Mol. Cell. Biol.* 24 (2004) 4267–4274.
- [12] M. Bienko, C.M. Green, N. Crosetto, F. Rudolf, G. Zapart, B. Coull, P. Kannouche, G. Wider, M. Peter, A.R. Lehmann, K. Hofmann, I. Dikic, Ubiquitin-binding domains in Y-family polymerases regulate translesion synthesis, *Science* 310 (2005) 1821–1824.
- [13] B.S. Plosky, A.E. Vidal, A.R. de Henestrosa, M.P. McLenigan, J.P. McDonald, S. Mead, R. Woodgate, Controlling the subcellular localization of DNA polymerases iota and eta via interactions with ubiquitin, *EMBO J.* 25 (2006) 2847–2855.
- [14] C. Guo, T.S. Tang, M. Bienko, J.L. Parker, A.B. Bielen, E. Sonoda, S. Takeda, H.D. Ulrich, I. Dikic, E.C. Friedberg, Ubiquitin-binding motifs in REV1 protein are required for its role in the tolerance of DNA damage, *Mol. Cell. Biol.* 26 (2006) 8892–8900.
- [15] P. Garg, P.M. Burgers, Ubiquitinated proliferating cell nuclear antigen activates translesion DNA polymerases eta and REV1, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102 (2005) 18361–18366.
- [16] L. Haracska, I. Unk, L. Prakash, S. Prakash, Ubiquitylation of yeast proliferating cell nuclear antigen and its implications for translesion DNA synthesis, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103 (2006) 6477–6482.
- [17] A.M. Cordonnier, A.R. Lehmann, R.P. Fuchs, Impaired translesion synthesis in xeroderma pigmentosum variant extracts, *Mol. Cell. Biol.* 19 (1999) 2206–2211.
- [18] R.L. Napolitano, R.P. Fuchs, New strategy for the construction of single-stranded plasmids with single mutagenic lesions, *Chem. Res. Toxicol.* 10 (1997) 667–671.
- [19] S. Tateishi, Y. Sakuraba, S. Masuyama, H. Inoue, M. Yamaizumi, Dysfunction of human Rad18 results in defective postreplication repair and hypersensitivity to multiple mutagens, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97 (2000) 7927–7932.
- [20] T.T. Huang, S.M. Nijman, K.D. Mirchandani, P.J. Galardy, M.A. Cohn, W. Haas, S.P. Gygi, H.L. Ploegh, R. Bernards, A.D. D'Andrea, Regulation of monoubiquitinated PCNA by DUB autocleavage, *Nat. Cell. Biol.* 8 (2006) 339–347.
- [21] H. Krokan, E. Wist, R.H. Krokan, Aphidicolin inhibits DNA synthesis by DNA polymerase alpha and isolated nuclei by a similar mechanism, *Nucleic Acids Res.* 9 (1981) 4709–4719.
- [22] S. Sarkar, A.A. Davies, H.D. Ulrich, P.J. McHugh, DNA interstrand crosslink repair during G1 involves nucleotide excision repair and DNA polymerase zeta, *EMBO J.* 25 (2006) 1285–1294.
- [23] S.C. Wang, Y. Nakajima, Y.L. Yu, W. Xia, C.T. Chen, C.C. Yang, E.W. McIntush, L.Y. Li, D.H. Hawke, R. Kobayashi, M.C. Hung, Tyrosine phosphorylation controls PCNA function through protein stability, *Nat. Cell. Biol.* 8 (2006) 1359–1368.
- [24] M. Treier, L.M. Staszewski, D. Bohmann, Ubiquitin-dependent c-Jun degradation in vivo is mediated by the delta domain, *Cell* 78 (1994) 787–798.

2. Article 2

Role of the ubiquitin-binding domain of Pol η in Rad18-independent translesion DNA synthesis in human cell extracts

Valérie Schmutz¹, Régine Janel-Bintz¹, Jérôme Wagner¹, Denis Biard², Naoko Shiomis³, Robert P. Fuchs⁴ and Agnès M. Cordonnier^{1,*}

¹CNRS FRE3211, ESBS, Université de Strasbourg, Bld Sébastien Brandt BP 10413, 67412 Illkirch Cedex, ²CEA-DSV-IRCM/INSERM U935, Institut A. Lwoff-CNRS, BP 8, 94801 Villejuif Cedex, France, ³Research Center for Charged Particle Therapy, Chiba 263-8555, Japan and ⁴Genome Instability and Carcinogenesis, CNRS UPR3081, Campus J. Aiguier, 13402 Marseille Cedex 20, France

Received April 3, 2009; Revised April 29, 2010; Accepted April 30, 2010

ABSTRACT

In eukaryotic cells, the Rad6/Rad18-dependent monoubiquitination of the proliferating cell nuclear antigen (PCNA) plays an essential role in the switching between replication and translesion DNA synthesis (TLS). The DNA polymerase Pol η binds to PCNA via a consensus C-terminal PCNA-interacting protein (PIP) motif. It also specifically interacts with monoubiquitinated PCNA thanks to a recently identified ubiquitin-binding domain (UBZ). To investigate whether the TLS activity of Pol η is always coupled to PCNA monoubiquitination, we monitor the ability of cell-free extracts to perform DNA synthesis across different types of lesions. We observe that a *cis*-syn cyclobutane thymine dimer (TT-CPD), but not a *N*-2-acetylaminofluorene-guanine (G-AAF) adduct, is efficiently bypassed in extracts from Rad18-deficient cells, thus demonstrating the existence of a Pol η -dependent and Rad18-independent TLS pathway. In addition, by complementing Pol η -deficient cells with PIP and UBZ mutants, we show that each of these domains contributes to Pol η activity. The finding that the bypass of a CPD lesion *in vitro* does not require Ub-PCNA but nevertheless depends on the UBZ domain of Pol η , reveals that this domain may play a novel role in the TLS process that is not related to the monoubiquitination status of PCNA.

INTRODUCTION

The translesion DNA synthesis (TLS) pathway is responsible for the vast majority of point mutations and is thus considered as a major process leading to genetic instability and carcinogenesis. Understanding the molecular mechanisms underlying this damage tolerance pathway and its regulation is therefore of major importance for our understanding of human pathogenesis.

In eukaryotes, TLS is carried out by specialized, low stringency, DNA polymerases belonging to the Y family (Pol η , Pol ι , Pol κ and Rev1) and the B family (Pol ζ). *In vivo* or *in vitro* studies have shown that these DNA polymerases have various substrate specificities and that, in many cases, TLS requires the concerted action of several TLS polymerases (1,2). Remarkably, human Pol η has the unique property to replicate past *cis*-syn cyclobutane thymine dimers, one of the major photoproducts induced by UV irradiation, with the same efficiency and accuracy than it does on undamaged DNA (3). The loss of Pol η activity underlies the high susceptibility to skin cancers of *Xeroderma pigmentosum* variant (XP-V) patients (4,5).

The mechanism by which TLS DNA polymerases gain access to the lesion site and take over the replicative polymerase to incorporate nucleotides opposite the damaged base is the subject of intense research. Numerous studies have highlighted the central role of replication processivity clamps (β -clamp in prokaryotes and PCNA in eucaryotes) in the fine tuning between replication and TLS. Yeast Pol η and human TLS polymerases such as Pol η , ι and κ functionally interact with the interconnecting loop of PCNA via their PCNA-interacting protein (PIP)

*To whom correspondence should be addressed. Tel: +03 68 85 46 93; Fax: +03 68 85 46 86; Email: cordonnier@esbs.u-strasbg.fr

The authors wish it to be known that, in their opinion, the first two authors should be regarded as joint First Authors.

© The Author(s) 2010. Published by Oxford University Press.

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/2.5>), which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

motif (6–8). Mutational inactivation of the PIP domain of Pol η sensitizes yeast cells to UV irradiation (9), while homologous mutations confer only moderate UV sensitivity in human cells (10,11). This suggests alternative targeting process(es) for the human polymerase. Recently, Acharya *et al.* (12) have identified a functional secondary PIP domain within the human Pol η that may explain the above-mentioned modest sensitivity. Furthermore, treatment of yeast or human cells with agents that affect DNA replication promotes the monoubiquitination of PCNA at its K164 residue by the Rad6–Rad18 enzyme complex (13). Genetic studies in *Saccharomyces cerevisiae* showed an epistatic relationship between PCNA-K164R mutation (a non ubiquitinatable form of PCNA) and deletion of the Pol η and Pol ζ TLS polymerases, demonstrating that TLS in this organism is largely dependent on the monoubiquitination of the replication processivity clamp (14). Vertebrate Y-family DNA polymerases preferentially interact with the monoubiquitinated form of PCNA (15,16) via Ubiquitin (Ub) binding domains designated UBZ (Pol η and Pol κ) or UBM (Pol ι and Rev1) that are required for their relocalization in nuclear foci after UV irradiation (10,17–19). In addition, it has been observed that some mutations in the UBZ domain of human Pol η have a much more drastic effect on UV cell survival than mutations in the C-terminal PIP domain (10). Consequently, it has been proposed that the binding of Y-family polymerases to the Ub moiety of PCNA is required for their access to the site of a stalled replication fork. Such a model highlighting a crucial role of PCNA ubiquitination in the regulation of TLS should however be tempered by the results on the extensive mutational analysis of the UBZ domain of Pol η conducted by Acharya *et al.* (12,20), which suggest that the binding of the Ub moiety by Pol η is not a necessary requirement for the ability of this polymerase to function in TLS of UV-induced DNA lesions.

Besides its role in facilitating the access of TLS polymerases to the lesion site, monoubiquitination of PCNA may also increase the kinetic of TLS by specialized DNA polymerases. Indeed, it has been shown that monoubiquitinated PCNA (Ub-PCNA) is more effective than the unmodified clamp in promoting yeast Pol η or Rev1 TLS activity across an abasic site *in vitro* (21). However, such a kinetic activation by Ub-PCNA was not confirmed in another study (22). Finally, TLS in vertebrate cells appears to be only partially dependent on Rad18 activity since UV-mutagenesis is reduced only 2-fold, in Rad18^{KO} (knock out) mouse cells (23). Furthermore, defective ubiquitination of PCNA in the chicken cell line DT40 is not epistatic to Pol κ and Rev1 mutants for UV sensitivity (24,25) indicating that at least these Y-family polymerases may be recruited in a Rad18-independent manner.

Taken together these data illustrate many aspects on the regulation of TLS by the post-translational status of PCNA that remain unclear and much debated. In an effort to elucidate these mechanisms and to investigate whether a Rad18-independent TLS pathway might operate in mammalian cells, we used Rad18-deficient cells and stable XPV fibroblast cell lines (XP30RO)

complemented with Pol η polymerases mutated in either their PIP or UBZ motifs. Protein extracts from these cell lines were prepared in order to analyze their ability to perform TLS across different DNA lesions. We could thus monitor the activity of Pol η in the presence or in the absence of Rad18 and PCNA ubiquitination, and the activity of Pol η variants that are differentially affected in their binding capacity to PCNA and/or to ubiquitin. We show that while Rad18 is required for the bypass of a *N*-2-acetylaminofluorene-guanine (G-AAF) lesion in cell-free extracts, it is dispensable for the bypass of a TT-CPD lesion. This implies that, under the experimental conditions tested here, the Pol η -dependent bypass of CPD is independent of Ub-PCNA. However, we also demonstrate that both the PIP and UBZ domains of Pol η facilitate the TLS reaction across both lesions. This result indicates that, in addition to its documented role in Ub-PCNA binding, the UBZ domain of Pol η may play a novel role in the TLS process that is not related to the ubiquitination status of PCNA.

MATERIAL AND METHODS

Plasmids and cell lines

Cells were grown at 37°C in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 10% fetal calf serum and gentamicin (0.5 mg/ml).

The human colon carcinoma cell line HCT116-Rad18^{KO} cell line (26) was cultured in the presence of G418 (300 μ g/ml) and puromycin (0.3 μ g/ml). MRC5-V1 cells are SV40-transformed normal human lung fibroblasts (27). The XP30RO cell line (SV40-transformed *X. pigmentosum* variant human fibroblasts) has a homozygous deletion in the Pol η gene resulting in a truncated protein of only 42 amino acids (4). XP30RO cell lines expressing wild type (wt) or mutated forms of Pol η were generated by transfection with a pcDNA3.1/zeo(-) plasmid harboring the corresponding Pol η sequence (kindly provided by P. Kannouche); transfected cells were thereafter selected with zeocin. Mutations in the coding sequence of Pol η were generated by site-directed mutagenesis. The sequences of the primers used for the generation of the D652A mutation are: 5'-CCAGAACA CATGGCATATCATTTTGCA-3' and: 5'-CATATCCC ATACCGGTACCAGGGA-3'. The Δ PIP deletion, generated by introducing a stop codon at position 705, consists in a deletion of the last nine amino acids of the Pol η amino acid sequence (QTLESFFKPLTH \rightarrow QTL). The sequences of the primers used for mutagenesis are: 5'-GAATCATTTTTTAAGCCATTAACA-3' and 5'-AC AATGTTTGCATGCCCTCAGGCCT-3'.

Rad18 gene silencing in MRC5 cells

siRNA design, cloning in pEBV vectors carrying a hygromycin B resistance cassette and establishment of stable knockdown or control cells were carried out as previously described (28). The RNAi sequence for Rad18 (NM_020165) stretches nucleotides 1459–1477. Control cells were obtained by stable transfection with the pBD650 vector that carries an inefficient shRNA (28).

The Rad18 knockdown and control cell lines were designated as MRC5-Rad18^{KD} and MRC5-CT, respectively. The transformed MRC5 cell lines were cultured in presence of hygromycin B (150 µg/ml, Roche).

Cell survival analysis

Cells were plated at 4000 (XP30RO) or 2500 (MRC5) cells per 10 cm diameter dish 24 h before UV irradiation (254 nm). After 7 days of culture in the presence of caffeine (1 mM), growing clones were fixed with 4% paraformaldehyde and stained with crystal violet in 10% ethanol. Clones containing more than 50 cells were counted. Experiments were performed at least four times. Colony formation was normalized as a percentage of the non-irradiated control.

Immunostaining

Cells grown on coverslips were UV-irradiated (15 J/m²) and cultured for 4 h. The cells were fixed with methanol/acetone (1/1, v/v) for 30 min at 4°C and washed three times with phosphate-buffered saline (PBS) supplemented with Tween-20 (0.1%; v/v). Cells were stained by overnight incubation (4°C) with a monoclonal anti-Rad18 antibody (Rad18 Ab57447, Abcam, 1:500 dilution) washed three times with PBS supplemented with Tween-20 (0.1%; v/v), and incubated for at least 2 h at room temperature with Alexa Fluor 488 goat anti-mouse IgG (1:2000, Molecular Probes). Observations were made with a Leica TCS4D confocal microscope equipped with an argon/krypton laser and suitable barrier filters.

Immunoblotting

Cell-free extracts (100 µg) were loaded onto SDS/polyacrylamide gels. After electrophoresis, separated proteins were transferred onto a PVDF membrane (Biorad) and probed with antibodies against Polη (C17, sc-5938), Polδ (A9, sc-17776) and PCNA (PC10, sc-56) from Santa Cruz Biotechnology. Anti-HA antibody (HA.11) was purchased from Covance.

Primer extension analysis and *in vitro* PCNA monoubiquitination assay

Construction of single-stranded plasmids containing either a CPD lesion (pUC-CPD.ss) or a single unique G-AAF adduct (pUC3G1-AAF.ss) has been extensively described (29). Primer extension analysis and standard ubiquitination assays were performed as previously described (30,31). Briefly, the reaction mixture (6.25 µl) containing 10 fmol of primed DNA and the whole-cell extract was incubated at 37°C in 50 mM HEPES-KOH (pH 7.8), 7 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 4 mM ATP, 500 µM of dNTPs, 40 mM creatine phosphate and 100 µg/ml creatine kinase. The reaction was stopped by adding an equal volume of proteinase K-SDS (4 mg/ml, 2%) and incubated for 30 min at 37°C. Purified replication products were further digested with EcoRI and PvuII restriction enzymes and analyzed by electrophoresis on a polyacrylamide-7 M urea denaturing gel. Quantification

of the levels of TLS was determined by phospho-imager analysis.

RESULTS

Rad18 is dispensable for the *in vitro* bypass of a CPD lesion while it is required for the bypass of an AAF adduct

In order to investigate whether Polη functions were strictly dependent on Ub-PCNA and whether this may depend upon the nature of the DNA lesion, we compared the ability of extracts from Rad18-proficient (wild type) or Rad18-deficient (Rad18^{KO}) HCT116 cells to synthesize DNA opposite either a CPD or an AAF lesion. HCT116-Rad18^{KO} cells were significantly more sensitive than wild-type HCT116 to DNA-damaging agents such as cisplatin and methyl methanesulfonate but only moderately sensitive to UV (26). Strikingly, the difference between wild-type and Rad18-deficient cells was only detectable at high UV doses (Figure 1A). By using single-stranded mono-modified plasmids, we have already shown that normal cell extracts are able to bypass a blocking lesion such as a G-AAF adduct (30). In this assay, the replicative machinery that extends the radiolabeled primer (located 91 nucleotides away from the adduct site), is blocked one nucleotide before the lesion (L-1; Figure 1C). Polη carries out the incorporation of a few nucleotides opposite and beyond the lesion site, and is then probably replaced by the replicative polymerase, as judged by the comparison of the extension profiles obtained with normal and XPV cell extracts (Figure 1C), or with XPV extracts complemented with Polη (Supplementary Figure S1A). Therefore, our *in vitro* assay may mimic the successive steps promoting the access of TLS polymerases to damaged DNA. Indeed, we have clearly established that PCNA is required for the TLS reaction (Supplementary Figure S1B). Furthermore PCNA is monoubiquitinated during such primer extension reactions (31). This post-translational modification of PCNA depends on both relatively long tracts of DNA synthesis and upon the presence of replication hurdles such as hairpin structures or a single G-AAF adduct or a TT-CPD lesion (31 and Supplementary Figure S2). The ability of cell-free extracts to perform both PCNA monoubiquitination and DNA synthesis across a lesion gives us the unique opportunity to investigate whether the TLS activity of Polη is coupled to this modification.

During primer extension, Ub-PCNA formation is easily detectable in HCT116 cell-free extracts, while it is abolished in HCT116-Rad18^{KO} cell-free extracts (Figure 1B). This demonstrates that under our conditions, the monoubiquitination reaction observed in cell-free extract is totally Rad18-dependent. As shown in Figure 1C, we observed that HCT116 cell-free extracts are able to bypass both CPD and AAF lesions, although higher efficiencies were observed for CPD. Extracts prepared from XP30RO cells which lack Polη are largely defective in TLS past either AAF or CPD lesions, indicating that Polη is involved in the bypass of both lesions. In Rad18-deficient cells, the bypass of the CPD lesion is as efficient as in

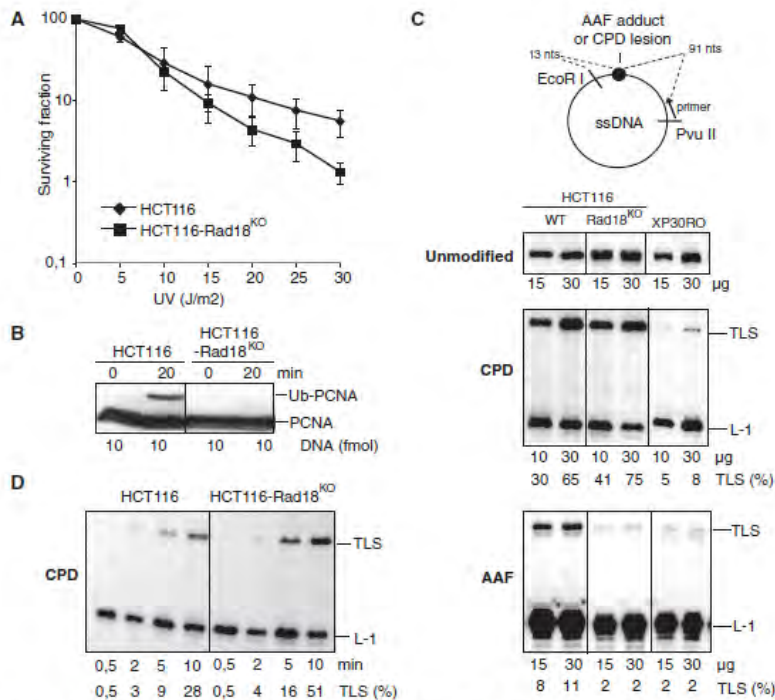


Figure 1. Analysis of Rad18 dependence of G-AAF or TT-CPD bypass in HCT116 cells. **(A)** UV survival curves of HCT116 and HCT116-Rad18^{KO} cells. **(B)** *In vitro* PCNA monoubiquitination. Cell-free extracts (30 μg) were incubated at 37°C in the presence of all four dNTPs and primed ssDNA (10 fmol) for 0 or 20 min, as indicated. Proteins were analyzed by immunoblotting with an antibody raised against PCNA. **(C)** Analysis of TLS catalyzed by various amounts of cell-free extracts from either HCT116, HCT116-Rad18^{KO} or XP30RO cell lines as indicated. DNA synthesis products obtained after 20 min incubation with undamaged pUC18.ss (unmodified), pUC-CPD.ss (CPD) or pUC3G1-AAF.ss (AAF) primed templates were analyzed by electrophoresis on a denaturing gel. L-1 and TLS tags: fragment elongated up to one nucleotide before the lesion site and up to the EcoRI restriction site, respectively. **(D)** Kinetic analysis of the CPD bypass. The pUC-CPD.ss substrate was incubated with cell-free extracts (30 μg) at 20°C and aliquots were withdrawn and quenched at indicated time intervals.

wild-type cell extracts, while the bypass of the AAF adduct is totally abolished (Figure 1C). These results were further confirmed in a time course experiment showing that prolonged incubation of up to 60 min did not allow the bypass of an AAF adduct to occur in the absence of Rad18 (data not shown). Conversely, the kinetics of TLS through the CPD lesion in both HCT116 and HCT116-Rad18^{KO} extracts are equivalent (Figure 1D). Together, these results indicate that Rad18 per se or the ubiquitination of PCNA is dispensable for the bypass of this lesion during primer extension in cell-free extracts.

We were concerned that the moderate UV sensitivity of HCT116-Rad18^{KO} cells as compared to HCT116 cells might reflect a particular UV damage tolerance of this cell line that may interfere with the Polη pathway. In order to confirm the results obtained with HCT116-Rad18^{KO} cells, we thus have extended our analysis on TLS efficiency through CPD and AAF lesions by using

a SV40-transformed MRC5 human fibroblast cell line in which Rad18 was stably silenced by means of long-term RNA interference. To assess the efficiency of Rad18 silencing, an MRC5 cell line ectopically expressing HA-tagged Rad18 protein was transfected with pEBV coding for shRNA against Rad18. After isolation of stable transformants upon hygromycin B selection, protein extracts were analyzed by immunoblotting with an anti-HA antibody. As shown in Figure 2A, expression of HA-Rad18 was drastically reduced in three independent cell clones expressing the shRNA against Rad18, while HA-Rad18 was readily detected as two bands, in extracts from either non-transfected cells (MRC5-HARad18-NT) or cells that express a non-related shRNA sequence (MRC5-HARad18-CT). This result demonstrates the effectiveness of the Rad18 shRNA sequence for silencing Rad18 expression. Therefore, this sequence was subsequently used to generate a MRC5-Rad18KD cell line in which endogenous Rad18 depletion was monitored by

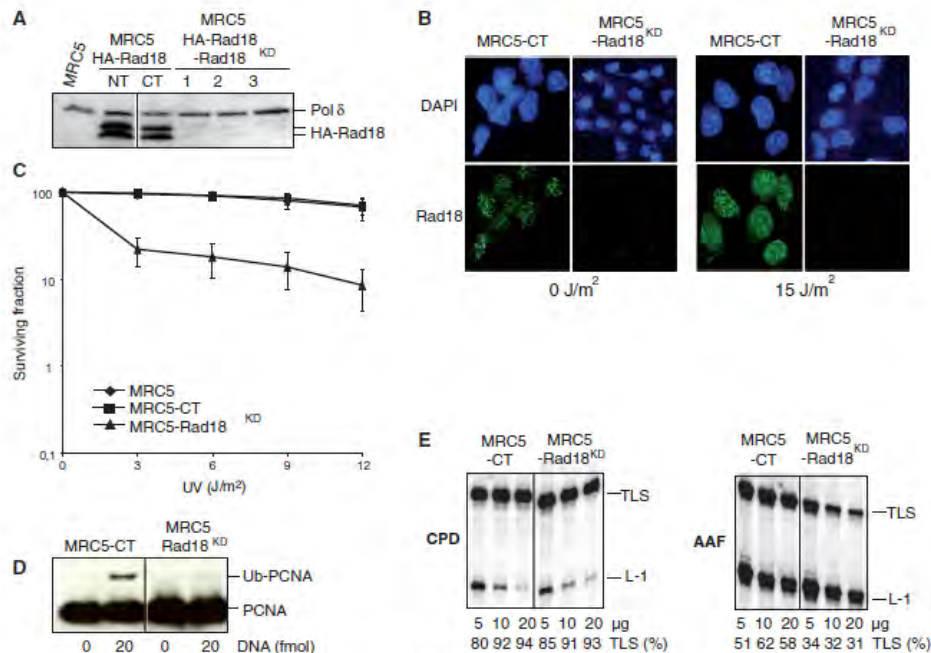


Figure 2. Characterization of MRC5-Rad18 knockdown cells. (A) Proteins from MRC5 cells, HA-Rad18-MRC5 cells (NT), HA-Rad18-MRC5 cells expressing non related shRNA (CT) or HA-Rad18-MRC5 cells expressing shRNA against Rad18 (lanes 1, 2 and 3 correspond to three independent clones) were analyzed by immunoblotting with an antibody raised against HA. The same membrane was also blotted with antibodies against p125, the catalytic subunit of Pol δ , as a loading control. (B) Representative images of MRC5-CT and MRC5-Rad18^{KD} stained cells. Cells were fixed with methanol 4 h after mock treatment (0 J/m²) or UV irradiation (15 J/m²) and stained with a Rad18 antibody to show the efficiency of Rad18 silencing. (C) UV survival curves of MRC5, MRC5-CT and MRC5-Rad18^{KD} cells. (D) *In vitro* PCNA monoubiquitination. Cell-free extracts (30 μ g) were incubated for 20 min at 37°C in the presence of all four dNTPs and 0 or 20 fmol of primed ssDNA as indicated. Proteins were analyzed by immunoblotting with an antibody raised against PCNA. (E) Analysis of TLS catalyzed by cellular extracts from either MRC5-CT and MRC5-Rad18^{KD} cells. DNA synthesis products obtained after 20 min incubation with cell-free extracts and undamaged pUC118.ss, pUC-CPD.ss or pUC3G1-AAF.ss primed templates were analyzed by electrophoresis on a denaturing gel.

immunostaining using an anti-Rad18 antibody (Figure 2B). The disappearance of the Rad18 signals in both non-irradiated and UV-irradiated MRC5-Rad18^{KD} cells demonstrate the efficiency of Rad18 depletion in the selected clone (Figure 2B). Efficient silencing of Rad18 in this cell line was further confirmed by the absence of PCNA monoubiquitination after UV irradiation (data not shown). MRC5-Rad18^{KD} cells also show increased sensitivity to UV as compared to MRC5 or MRC5-CT cells that express a non-related shRNA sequence (Figure 2C).

We previously noticed that induction of Ub-PCNA during primer extension is much more efficient than that after UV irradiation of cultured cells (31). While Ub-PCNA is easily observable in control cell extracts, it is barely detected in MRC5-Rad18^{KD} cell extracts (Figure 2D). As shown previously with HCT116 cells, extracts prepared from both Rad18-proficient and -deficient MRC5 cells were able to carry out TLS through a CPD lesion with equal efficiency (Figure 2E). In contrast, MRC5-Rad18^{KD} extracts show reduced TLS capacities

opposite an AAF adduct (Figure 2E). Quantitative analysis of the data shows that TLS activity through an AAF-modified substrate in the MRC5-Rad18^{KD} cell extracts drops to about 50% of that measured in control cell extracts. We consider that the remaining PCNA monoubiquitination observed in MRC5-Rad18^{KD} cell extracts (Figure 2D) may be responsible for the residual Pol η -dependent TLS activity through an AAF adduct in these assays.

Data from both HCT116-Rad18^{KO} and MRC5-Rad18^{KD} cell extracts demonstrate that Rad18 activity is dispensable for the bypass of a CPD lesion *in vitro* while it is required for the bypass of an AAF adduct. Altogether, our observations strongly suggest the existence of both Rad18-dependent and -independent Pol η -mediated TLS pathways.

UV survival of XP30RO cells expressing PIP and UBZ mutants of Pol η

The Pol η -deficient XP30RO cell line was used to generate several clones stably expressing different mutants of Pol η .

The Δ PIP mutation consists of a deletion of the last nine amino acids of the Pol η sequence containing the PCNA binding site consensus sequence (6,32). The UBZ mutation consists of a D to A mutation at position 652. The solution structure of this domain shows a classical zinc-finger structure coupled with a carboxy-terminal, a helix that mediates the interaction with ubiquitin (33). The D652 residue, lying in the α -helix, is conserved in both yeast and vertebrate Pol η and was shown, by co-immunoprecipitation assays and by yeast two-hybrid analysis (10; A.C., unpublished results) to be essential for Ub binding. The single D652A as well as the double mutant D652A- Δ PIP were constructed.

The UV sensitivity of stable transformants expressing mutated Pol η was determined using a colony-forming assay (Figure 3). XP30RO cells expressing either wild-type Pol η (WT) or the empty vector (V) were included as positive and negative controls, respectively. We found a strong positive correlation between the ability of Δ PIP Pol η mutants to complement the UV sensitivity of XPV cells and the level of ectopic expression of the Pol η protein in the different clones analyzed (Figure 3A and C). This result emphasizes the crucial importance of controlling the expression level of a protein in complementation assays. Indeed, while high levels of expression of the Δ PIP Pol η allows an almost complete restoration of UV survival, the Δ PIP mutant clone expressing the lowest levels of Pol η fails to efficiently complement the UV sensitivity of XPV cells.

On the other hand, the UBZ domain mutant, is only partially able to complement the UV sensitivity of XPV cells, whatever its expression level (Figure 3B and C). Finally, the UV survival of the transfectant expressing a high level of the double mutant D652A- Δ PIP Pol η was significantly lower than either of the single mutants (Figure 3B). Altogether, these observations are consistent with a model in which both the PIP motif and the D652 residue within UBZ domain contribute to the *in vivo* functions of Pol η .

Both PIP and UBZ domains of Pol η contribute to CPD and AAF bypass *in vitro*

In order to analyze the contribution of the PIP and/or UBZ domains to Pol η 's TLS function, extracts from cells expressing the different mutants were prepared and assayed for *in vitro* bypass through either CPD or AAF lesions. With extracts from cell lines expressing the mutated Pol η at moderate levels (lower than 10-fold above the MRC5 basal level; Figure 4B), we observed a decrease in the amount of TLS products in comparison with the wild-type control (Figure 4A). These results suggest that mutations in either of these two domains significantly reduce the bypass efficiency through both lesions, even if the PIP truncation appears to have a more pronounced effect than the D652A mutation on the bypass efficiency (compared at identical levels of Pol η expression: lanes 2 with lanes 6 and lanes 3 with lanes 7).

Finally, cell extract from the D652A- Δ PIP Pol η double mutant, although containing a high level of Pol η cannot

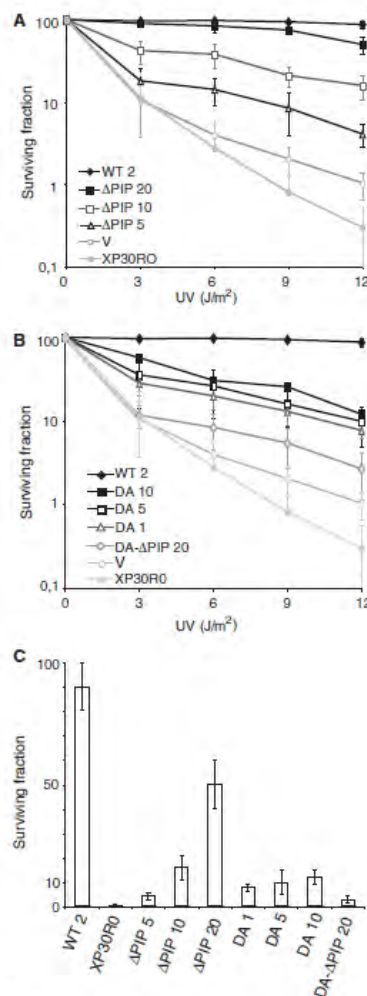


Figure 3. Requirement of PIP and UBZ domains of Pol η for its function in UV damages tolerance *in vivo*. UV sensitivity of XP30RO and XP30RO transformed cell lines expressing different levels of mutant Pol η . (A) WT and Δ PIP mutants; V, empty vector (B) WT, D652A mutants (DA) and D652A- Δ PIP mutant (DA- Δ PIP); V, empty vector. The numbers in front of the different cell lines indicate the expression levels of ectopic Pol η as compared to MRC5 cells (Figure 4B). (C) Survival of XP30RO and XP30RO transformed cell lines expressing different levels of mutant Pol η following UV irradiation at 12 J/m².

restore efficient TLS through G-AAF or TT-CPD lesions. Altogether, these data show that, in accordance with the *in vivo* studies, both regions of Pol η participate to its function. Interestingly, despite the independence of the CPD bypass with regard to Rad18, the D652 residue

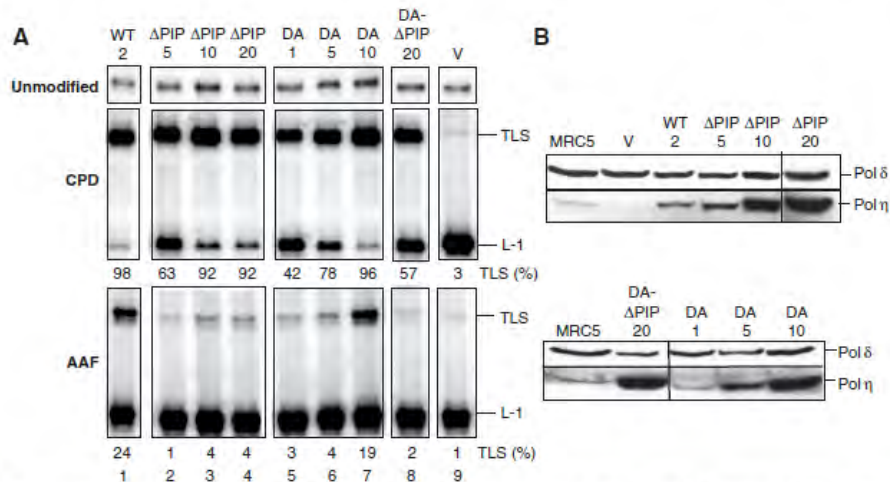


Figure 4. Relative contribution of the PIP and UBZ domains of Pol η for the *in vitro* bypass of CPD and AAF lesions. (A) Cell-free extracts were prepared from the various complemented XP30RO cell lines (see legend to Figure 3) and tested for their ability to perform TLS through AAF and CPD lesions, as indicated. (B) Amounts of Pol η proteins in the various cell-free extracts (100 μ g) were analyzed by immunoblotting with an antibody raised against Pol η . As a loading control, the same membrane was blotted with antibodies against p125, the catalytic subunit of Pol δ .

within the UBZ domain contributes to the bypass of a CPD lesion *in vitro*. In turn, this points to a specific role of the D652 residue that does not involve interaction of Pol η with the ubiquitin moiety of the modified PCNA.

DISCUSSION

Bypass of TT-CPD, in contrast to G-AAF, is independent of Rad18 in cell-free extracts

Our results demonstrate that, in cell-free extracts, Rad18 is dispensable for the bypass of a CPD lesion while it is required for the bypass of an AAF adduct (Figures 1 and 2). While we cannot rule out a minor undetectable Rad18-independent monoubiquitination of PCNA (34–36), we infer from these data that CPD bypass in cell-free extracts is independent of Ub-PCNA. Our observation is consistent with a recent report showing that Pol η is able to gain access to replication complexes and to catalyze TLS through CPD dimers in the presence of the non-ubiquitinable K164R PCNA mutant during replication of double-stranded DNA in HeLa cell-free extracts (37). What could be the rationale for such a difference between the CPD lesion and the AAF adduct? One obvious difference is the facility by which each of these lesions is bypassed by Pol η . Steady-state kinetic analysis have shown that purified yeast and human Pol η can replicate through a T–T CPD dimer with the same kinetics and fidelity as through an undamaged T–T sequence (38,39), while the bypass kinetics of a G-AAF adduct by purified human Pol η is significantly lower (40). By altering the Pol η –PCNA interaction, monoubiquitination of the clamp may directly stimulate Pol η TLS activity through the AAF adduct, as previously shown *in vitro* for an abasic

site (21). Ub-PCNA may also recruit additional co-factors that could facilitate the Pol η -dependent bypass of the AAF adduct. Alternatively, Rad18 per se may be required for this specific reaction since it has been shown that interaction of Rad18 with Pol η participates in the polymerase function *in vivo* (16).

Contributions of the PCNA- and ubiquitin-binding domains to the activity of Pol η *in vivo*

We examined the ability of PIP truncation and D652A Pol η mutants to complement the UV sensitivity of XP30RO cell line. Consistent with the predicted essential role of the PIP domain in PCNA binding, we found that expression of the Δ PIP Pol η mutant (even fivefold above the MRC5 basal level) results in a substantial sensitization of the cells as compared to those expressing exogenous WT Pol η . Surprisingly, this mutation can be compensated by high overexpression of the mutant polymerase, raising the possibility that the secondary PIP domain recently identified within the Pol η sequence (12) may substitute for the C-terminal one, although with a lower efficiency. The hypothesis that the binding of the Ub moiety on PCNA via the UBZ domain may replace the Pol η PIP–PCNA interaction seems unlikely since recent structural studies have shown that the PIP motif contributes more significantly to the interaction between Pol η and PCNA than the UBZ domain (33,41). Alternatively, the defect in the targeting of Pol η to the DNA template/primer junction by the C-terminal PIP domain might be compensated by interaction with other proteins, such as Rad18 or Rev1, that may recruit Pol η to the replication stalling sites (16,42).

In agreement with our data, it has already been shown that a mutation of the D652 residue resulted in UV sensitivity in yeast and human cells (12,20,43). When overproduced about 10-fold, both D652A and Δ PIP Pol η mutants partially complement the UV sensitivity of XPV cells to the same extent. While complementation by the Δ PIP Pol η mutant varies notably with the expression level within a 1- to 10-fold overexpression range, complementation with the D652A Pol η mutant does not change significantly with the level of overproduction (Figure 3C). We conclude from these results that the D652 residue of Pol η participates in a specific role that is not exchangeable with that of the PIP domain and that is essential for full activity of Pol η .

Alternative models for the role of the Pol η UBZ domain in TLS through a CPD lesion

We also examined the effects of Pol η PIP truncation and D652A mutation on the ability of cell-free extracts to promote TLS through a CPD lesion and an AAF adduct. We observed that whatever the lesion, both mutations impair TLS efficiency *in vitro*. This result together with the UV survival analysis of XP30RO cells complemented with PIP and UBZ mutants, are in agreement with a model in which both regions contribute to Pol η function in TLS (10,12,20,43). The dependence of TLS on the PIP motif confirms the involvement of PCNA in the reaction since it has been shown that this motif mediates a functional interaction between Pol η and PCNA (6). Interestingly, while Rad18 is not required for the bypass through a CPD lesion, we observed that the D652 residue, which is involved in the interaction with ubiquitin, contributes to this reaction. This result suggests that, for the bypass of this specific lesion, the UBZ domain of Pol η may bind the ubiquitin moiety of a modified protein that is ubiquitinated in a Rad18-independent manner. Another possibility might be that the D652A mutation abrogates a novel, uncharacterized, function of the Pol η UBZ domain that is distinct from ubiquitin binding. In agreement with this latter interpretation, recent genetic data provide evidences that some mutations in the C2H2 motif of the UBZ domain of Pol η impair the binding to ubiquitin but have no perceptible effect on UV sensitivity and UV mutagenesis (12,20), suggesting that the binding of ubiquitin by Pol η via its UBZ domain is not a necessary prerequisite for Pol η to function in TLS.

CONCLUSION

Despite the recent advances in the knowledge of the TLS process, the mechanisms by which the TLS Pols gain access to the template-primer junction when the replicative machinery encounters a blocking lesion remain unclear. Several data indicate that Pol η contributes not only to gap filling after the replication apparatus has moved away from the damaged site, but also helps to maintain the continuous progression of the replication fork after DNA damaging treatment. Indeed, as compared to WT cells, XPV cells accumulate shorter replication products after UV irradiation and elongation of

these intermediates was markedly retarded (25,44). We propose that, depending on the nature of the lesion (and its sequence context), different mechanisms control Pol η activity. Efficient bypass of lesions that do not require Rad18-dependent PCNA monoubiquitination, as a T-T CPD dimer, may occur 'on the fly' during processive DNA synthesis, without actual uncoupling of the replicative polymerases. If this first TLS trial is not successful, the uncoupling of leading and lagging strand synthesis provides the substrate for Rad6/Rad18-dependent PCNA monoubiquitination. Rad18 and Ub-PCNA may then facilitate the bypass reaction as exemplified here by the analysis of the AAF adduct TLS. We were concerned that our system may not be fully relevant to test this model, since the CPD lesion is located on a ssDNA template and is thus able to stimulate PCNA monoubiquitination in the absence of fork uncoupling (Supplementary Figure S2). However, as shown in Figures 1 and 2, this modification is clearly dispensable for Pol η to bypass a CPD lesion.

We have established that in cell-free extracts, TLS of both an AAF adduct and a CPD lesion requires the UBZ domain. We speculate that this domain plays a dual role in the TLS process. On one hand, it may mediate the binding to Ub-PCNA during the gap filling reaction. On the other hand, the D652 residue may participate in a distinct function, such as the interaction with another protein that is necessary for the coordination of the Pol η activity at the replication fork. In agreement with this model, Edmunds *et al.* (25) have recently shown that, in DT40 cells, PCNA monoubiquitination is dispensable for maintaining replication fork progression on damaged DNA while it is required post-replicatively. Interestingly, the data presented in this latter paper show that the UBM domains of Rev1 are required for its activity at the replication fork in the absence of Ub-PCNA. Thus, it is conceivable that the regulatory mechanism described in this study may apply to the UBD domain of Y-family polymerases in general.

SUPPLEMENTARY DATA

Supplementary data are available at NAR Online.

ACKNOWLEDGEMENTS

We are grateful to M. Bichara for advice and comments on the article, Dr Hubscher, U. (University of Zurich, Switzerland) for providing His-p21 and Dr Hurwitz, J. (Memorial Sloan-Kettering Cancer Center, New York) for recombinant tagged PCNA.

FUNDING

l'Institut National du Cancer (PL028); la Ligue Régionale contre le Cancer. Funding for open access charge: Centre National de la Recherche Scientifique.

Conflict of interest statement. None declared.

REFERENCES

- Prakash,S. and Prakash,L. (2002) Translesion DNA synthesis in eukaryotes: a one- or two-polymerase affair. *Genes Dev.*, **16**, 1872–1883.
- Shachar,S., Ziv,O., Avkin,S., Adar,S., Wittschieben,J., Reissner,T., Chaney,S., Friedberg,E.C., Wang,Z., Carell,T. *et al.* (2009) Two-polymerase mechanisms dictate error-free and error-prone translesion DNA synthesis in mammals. *EMBO J.*, **28**, 383–393.
- McCulloch,S.D., Kokoska,R.J., Chilkova,O., Welch,C.M., Johansson,E., Burgers,P.M. and Kunkel,T.A. (2004) Enzymatic switching for efficient and accurate translesion DNA replication. *Nucleic Acids Res.*, **32**, 4665–4675.
- Masutani,C., Kusumoto,R., Yamada,A., Dohmae,N., Yokoi,M., Yuasa,M., Araki,M., Iwai,S., Takio,K. and Hanaoka,F. (1999) The XPV (xeroderma pigmentosum variant) gene encodes human DNA polymerase η . *Nature*, **399**, 700–704.
- Johnson,R.E., Prakash,S. and Prakash,L. (1999) Efficient bypass of a thymine-thymine dimer by yeast DNA polymerase. *Poleta. Science*, **283**, 1001–1004.
- Haracska,L., Johnson,R.E., Unk,I., Phillips,B., Hurwitz,J., Prakash,L. and Prakash,S. (2001) Physical and functional interactions of human DNA polymerase η with PCNA. *Mol. Cell. Biol.*, **21**, 7199–7206.
- Haracska,L., Johnson,R.E., Unk,I., Phillips,B.B., Hurwitz,J., Prakash,L. and Prakash,S. (2001) Targeting of human DNA polymerase ι to the replication machinery via interaction with PCNA. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **98**, 14256–14261.
- Haracska,L., Prakash,L. and Prakash,S. (2002) Role of human DNA polymerase κ as an extender in translesion synthesis. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **99**, 16000–16005.
- Haracska,L., Kondratieck,C.M., Unk,I., Prakash,S. and Prakash,L. (2001) Interaction with PCNA is essential for yeast DNA polymerase η function. *Mol. Cell*, **8**, 407–415.
- Bienko,M., Green,C.M., Crosetto,N., Rudolf,F., Zapart,G., Coull,B., Kannouche,P., Wider,G., Peter,M., Lehmann,A.R. *et al.* (2005) Ubiquitin-binding domains in Y-family polymerases regulate translesion synthesis. *Science*, **310**, 1821–1824.
- Guéranger,Q., Stary,A., Aoufouchi,S., Fali,A., Sarasin,A., Reynaud,C.A. and Weill,J.C. (2008) Role of DNA polymerases η , ι and ζ in UV resistance and UV-induced mutagenesis in a human cell line. *DNA Repair*, **7**, 1551–1562.
- Acharya,N., Yoon,J.H., Gali,H., Unk,I., Haracska,L., Johnson,R.E., Hurwitz,J., Prakash,L. and Prakash,S. (2008) Roles of PCNA-binding and ubiquitin-binding domains in human DNA polymerase η in translesion DNA synthesis. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **105**, 17724–17729.
- Hoegge,C., Pfander,B., Moldovan,G.L., Pyrowolakis,G. and Jentsch,S. (2002) RAD6-dependent DNA repair is linked to modification of PCNA by ubiquitin and SUMO. *Nature*, **419**, 135–141.
- Stelter,P. and Ulrich,H.D. (2003) Control of spontaneous and damage-induced mutagenesis by SUMO and ubiquitin conjugation. *Nature*, **425**, 188–191.
- Kannouche,P.L. and Lehmann,A.R. (2004) Ubiquitination of PCNA and the polymerase switch in human cells. *Cell Cycle*, **3**, 1011–1013.
- Watanabe,K., Tateishi,S., Kawasuji,M., Tsurimoto,T., Inoue,H. and Yamaizumi,M. (2004) Rad18 guides poleta to replication stalling sites through physical interaction and PCNA monoubiquitination. *EMBO J.*, **23**, 3886–3896.
- Guo,C., Tang,T.S., Bienko,M., Parker,J.L., Bielen,A.B., Sonoda,E., Takeda,S., Ulrich,H.D., Dikic,I. and Friedberg,E.C. (2006) Ubiquitin-binding motifs in REV1 protein are required for its role in the tolerance of DNA damage. *Mol. Cell Biol.*, **26**, 8892–8900.
- Plosky,B.S., Vidal,A.E., Fernandez de Henestrosa,A.R., McLenigan,M.P., McDonald,J.P., Mead,S. and Woodgate,R. (2006) Controlling the subcellular localization of DNA polymerases ι and η via interactions with ubiquitin. *EMBO J.*, **25**, 2847–2855.
- Guo,C., Tang,T.S., Bienko,M., Dikic,I. and Friedberg,E.C. (2008) Requirements for the interaction of mouse Polkappa with ubiquitin and its biological significance. *J. Biol. Chem.*, **283**, 4658–4664.
- Acharya,N., Brahma,A., Haracska,L., Prakash,L. and Prakash,S. (2007) Mutations in the ubiquitin binding UBZ motif of DNA polymerase η do not impair its function in translesion synthesis during replication. *Mol. Cell. Biol.*, **27**, 7266–7272.
- Garg,P. and Burgers,P.M. (2005) Ubiquitinated proliferating cell nuclear antigen activates translesion DNA polymerases η and REV1. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **102**, 18361–18366.
- Haracska,L., Unk,I., Prakash,L. and Prakash,S. (2006) Ubiquitylation of yeast proliferating cell nuclear antigen and its implications for translesion DNA synthesis. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **103**, 6477–6482.
- Tateishi,S., Niwa,H., Miyazaki,J., Fujimoto,S., Inoue,H. and Yamaizumi,M. (2003) Enhanced genomic instability and defective postreplication repair in RAD18 knockout mouse embryonic stem cells. *Mol. Cell. Biol.*, **23**, 474–481.
- Okada,T., Sonoda,E., Yamashita,Y.M., Koyoshi,S., Tateishi,S., Yamaizumi,M., Takata,M., Ogawa,O. and Takeda,S. (2002) Involvement of vertebrate polkappa in Rad18-independent postreplication repair of UV damage. *J. Biol. Chem.*, **277**, 48690–48695.
- Edmunds,C.E., Simpson,L.J. and Sale,J.E. (2008) PCNA ubiquitination and REV1 define temporally distinct mechanisms for controlling translesion synthesis in the avian cell line DT40. *Mol. Cell*, **30**, 519–529.
- Shiomi,N., Mori,M., Tsuji,H., Imai,T., Inoue,H., Tateishi,S., Yamaizumi,M. and Shiomi,T. (2007) Human RAD18 is involved in S phase-specific single-strand break repair without PCNA monoubiquitination. *Nucleic Acids Res.*, **35**, e9.
- Huschtscha,L.I. and Holliday,R. (1983) Limited and unlimited growth of SV40-transformed cells from human diploid MRC-5 fibroblasts. *J. Cell Sci.*, **63**, 77–99.
- Biard,D.S., Despras,E., Sarasin,A. and Angulo,J.F. (2005) Development of new EBV-based vectors for stable expression of small interfering RNA to mimic human syndromes: application to NER gene silencing. *Mol. Cancer Res.*, **3**, 519–529.
- Napolitano,R.L. and Fuchs,R.P. (1997) New strategy for the construction of single-stranded plasmids with single mutagenic lesions. *Chem. Res./Toxicol.*, **10**, 667–671.
- Cordonnier,A.M., Lehmann,A.R. and Fuchs,R.P. (1999) Impaired translesion synthesis in xeroderma pigmentosum variant extracts. *Mol. Cell. Biol.*, **19**, 2206–2211.
- Schmutz,V., Wagner,J., Janel-Bintz,R., Fuchs,R.P. and Cordonnier,A.M. (2007) Requirements for PCNA monoubiquitination in human cell-free extracts. *DNA Repair*, **6**, 1726–1731.
- Kannouche,P., Broughton,B.C., Volker,M., Hanaoka,F., Mullenders,L.H. and Lehmann,A.R. (2001) Domain structure, localization, and function of DNA polymerase η , defective in xeroderma pigmentosum variant cells. *Genes Dev.*, **15**, 158–172.
- Bomar,M.G., Pai,M.T., Tzeng,S.R., Li,S.S. and Zhou,P. (2007) Structure of the ubiquitin-binding zinc finger domain of human DNA γ -polymerase η . *EMBO Rep.*, **8**, 247–251.
- Simpson,L.J., Ross,A.L., Szuts,D., Alviani,C.A., Oestergaard,V.H., Patel,K.J. and Sale,J.E. (2006) RAD18-independent ubiquitination of proliferating-cell nuclear antigen in the avian cell line DT40. *EMBO Rep.*, **7**, 927–932.
- Zhang,S., Chea,J., Meng,X., Zhou,Y., Lee,E.Y. and Lee,M.Y. (2008) PCNA is ubiquitinated by RNF8. *Cell Cycle*, **7**, 3399–3404.
- Terai,K., Abbas,T., Jazaeri,A.A. and Dutta,A. (2010) CRL4^{AtD} E3 ubiquitin ligase monoubiquitinates PCNA to promote translesion DNA synthesis. *Mol. Cell*, **37**, 143–149.
- Nikolaishvili-Feinberg,N., Jenkins,G.S., Nevis,K.R., Staus,D.P., Scarlett,C.O., Unsal-Kacmaz,K., Kaufmann,W.K. and Cordeiro-Stone,M. (2008) Ubiquitylation of proliferating cell nuclear antigen and recruitment of human DNA polymerase η . *Biochemistry*, **47**, 4141–4150.
- Johnson,R.E., Washington,M.T., Prakash,S. and Prakash,L. (2000) Fidelity of human DNA polymerase η . *J. Biol. Chem.*, **275**, 7447–7450.
- Washington,M.T., Johnson,R.E., Prakash,S. and Prakash,L. (2000) Accuracy of thymine-thymine dimer bypass by

- Saccharomyces cerevisiae* DNA polymerase ϵ . *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **97**, 3094–3099.
40. Masutani, C., Kusumoto, R., Iwai, S. and Hanaoka, F. (2000) Mechanisms of accurate translesion synthesis by human DNA polymerase ϵ . *EMBO J.*, **19**, 3100–3109.
41. Hishiki, A., Hashimoto, H., Hanafusa, T., Kamei, K., Ohashi, E., Shimizu, T., Ohmori, H. and Sato, M. (2009) Structural basis for novel interactions between human translesion synthesis polymerases and PCNA. *J. Biol. Chem.*, doi:10.1074/jbc.M809745200 [Epub ahead of print; 10 February 2009].
42. Yuasa, M.S., Masutani, C., Hirano, A., Cohn, M.A., Yamazumi, M., Nakatani, Y. and Hanaoka, F. (2006) A human DNA polymerase ϵ complex containing Rad18, Rad6 and Rev1: proteomic analysis and targeting of the complex to the chromatin-bound fraction of cells undergoing replication fork arrest. *Genes Cells*, **11**, 731–744.
43. Parker, J.L., Bielen, A.B., Dikic, I. and Ulrich, H.D. (2007) Contributions of ubiquitin- and PCNA-binding domains to the activity of polymerase ϵ in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res.*, **35**, 881–889.
44. Lehmann, A.R., Kirk-Bell, S., Arlett, C.F., Paterson, M.C., Lohman, P.H., de Weerd-Kastelein, E.A. and Bootsma, D. (1975) Xeroderma pigmentosum cells with normal levels of excision repair have a defect in DNA synthesis after UV-irradiation. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **72**, 219–223.

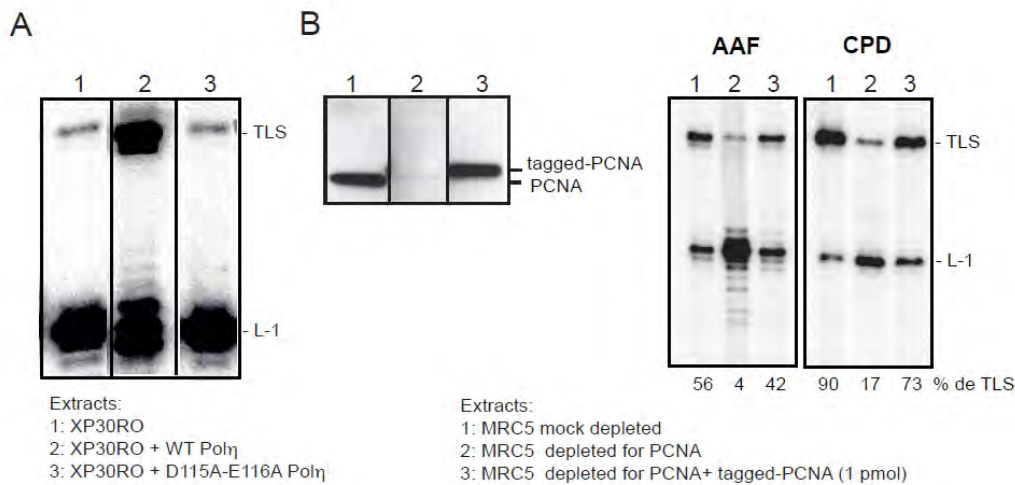


Figure S1

(A) Pol η produced *in vitro* by transcription/translation in reticulocyte lysates fully complement the bypass deficiency of XP30RO cell-free extracts.

DNA synthesis products obtained after 20 min incubation with 30 μ g of cell-free extract and pUC3G1-AAF.ss primed template were analyzed by electrophoresis on 6% denaturing polyacrylamide gel. Complementation is abolished by mutations in the highly conserved motif 113SIDE₁₁₆ of the catalytic site of Pol η .

(B) PCNA is required for efficient TLS through both G-AAF adduct and TT-CPD lesion.

MRC5 cell free extract (100 μ g) was mixed with His-p21 fusion protein (5 μ g) bound to Ni-NTA magnetic agarose beads (Quiagen) in a final volume of 20 μ l of binding buffer (50 mM HEPES-KOH pH7.9, 50 mM NaCl) for 1.5 h at 4°C. The unbound supernatant was used directly for reaction.

Left panel: Western Blot analysis using an antibody against PCNA of either non depleted MRC5 extract (lane 1), extract depleted for PCNA (lane 2).

Recombinant tagged PCNA was added to depleted extract in lane 3.

Right panel: Cell-free extracts (10 μ g) were incubated 20 min at 37°C with monomodified primed templates (AAF or CPD). DNA synthesis products were analyzed as indicated above.

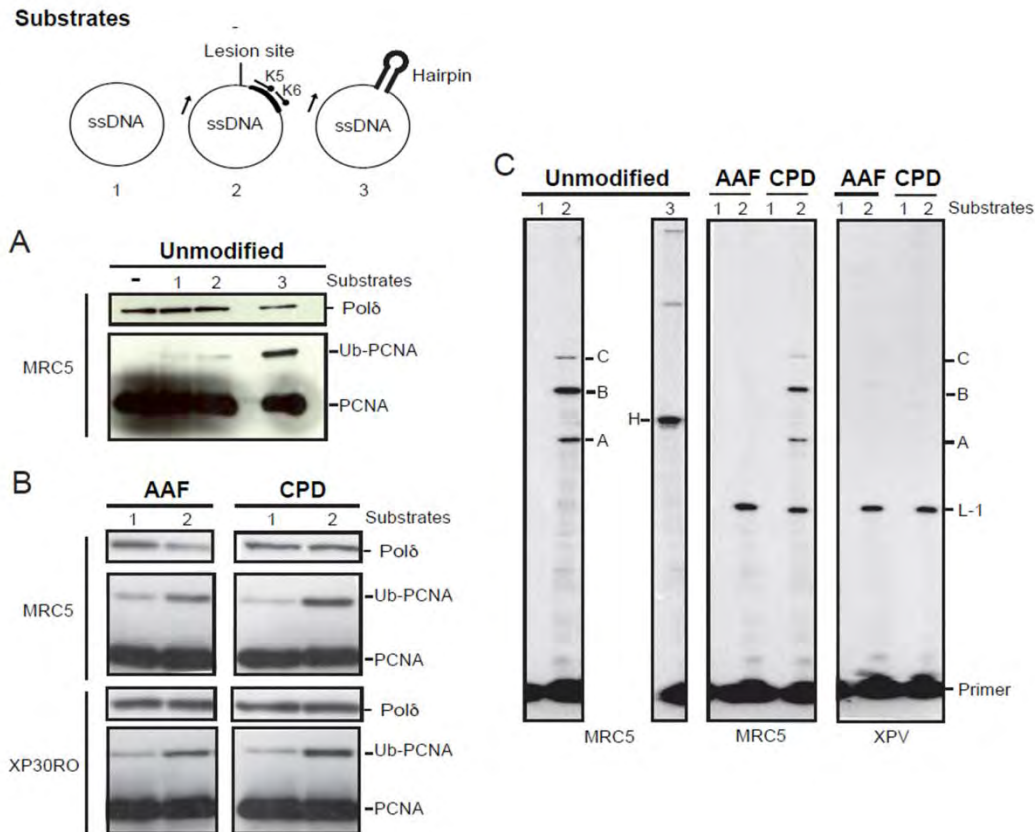


Figure S2. We have previously shown (31) that secondary structures formed in the ssDNA template (referred as “hairpin” in the figure) are able to elicit efficient PCNA monoubiquitination upon primer extension in cell-free extract (panel A lane 3).

In order to delimit a portion of template DNA without any pausing site, we hybridized the primed circular ssDNA template with two contiguous 3'-biotinylated oligonucleotides (K5 and K6) that impair the hairpin formation.

Substrates DNA are incubated 10 minutes at 37°C with cell-free extracts as indicated, in the presence of streptavidin to prevent elongation of the oligonucleotides K5 and K6. Aliquots of the same reactions are analyzed by Western blot using an antibody against PCNA or Polδ (Panel A and B) and by electrophoresis on denaturing gel to analyzed DNA synthesis products.

Panel A: Monoubiquitination of PCNA is inefficient on unmodified DNA, except when the hairpin can form (substrate 3).

Panel B: A CPD lesion or an AAF adduct are able to stimulate PCNA monoubiquitination to the same extent in both MRC5 and XP30RO cell-free extracts

Panel C: Primer extension analysis on a 6% acrylamide gel-7M urea

L-1: Elongation products up to one nucleotide before the lesion site

H: Elongation product up to the hairpin site

A: Elongation products up to the 5' end of oligonucleotide K5

B: Elongation products up to the 5' end of oligonucleotide K6

C: Elongation products B ligated with oligonucleotide K6

The sequences of the oligonucleotides used to block the primer extension are

K5: 5'- GCT GTT TCC TGT GTG AAA TTG TTA TCC GC-3'

K6: 5'- TCA CAA TTC CAC ACA ACA TAC GAG CCG G-3'

3. Matériel et méthodes supplémentaires

A. Electrophorèse bi-dimensionnelle

1. Préparation des échantillons

Un extrait de cellules MRC5 (3 mg) est incubé 20 min à 37°C en absence ou en présence d'un ADN simple-brin (5 µg) hybridé à une amorce portant une biotine en 5'. Le substrat est immobilisé sur des billes magnétiques (625 µg) recouvertes de streptavidine. Après l'incubation, les billes sont lavées deux fois dans le tampon. Les protéines capturées sont éluées puis sont précipitées au TCA (10% final). Le culot est lavé avec de l'acétone froid et resuspendu dans 125 µl de tampon IEF (urée 7M; thiourée 2M; CHAPS 4%; Tris pH8 20mM; DTT 20mM; ampholyte 0.2%; bleu de bromophénol 0.004%). Le tampon IEF est stocké à -20°C et le DTT, l'ampholyte et le bromophénol sont rajoutés extemporanément. La quantité de protéines resuspendues est dosée par la méthode de Bradford (Tableau 6).

Tableau 6: Dosage Bradford

| | 0 | 4 µg | 8 µg | 12 µg | 16 µg | 20 µg | Echantillon |
|-----------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------------|
| BSA (2mg/ml) | | 2 µl | 4 µl | 6 µl | 8 µl | 10 µl | X |
| HCL (0.1N) | 2 µl | 2 µl | 2 µl | 2 µl | 2 µl | 2 µl | 2 µl |
| Tampon IEF (qsp 20µl) | 18 µl | 16 µl | 14 µl | 12 µl | 10 µl | 8 µl | 18- X µl |
| Bradford 1x | | 1 ml | 1 ml | 1 ml | 1 ml | 1 ml | 1 ml |

2. Première dimension

a. Réhydratation

L'échantillon est déposé dans un puits du plateau de focalisation. Une bandelette dans laquelle est établie un gradient de pH de 3 à 10 est déposée dans le puits, le gel vers le bas, en évitant de piéger des bulles d'air, puis est recouverte par 1 ml d'huile pour éviter l'évaporation. La réhydratation a lieu toute la nuit à 50V.

b. Focalisation isoélectrique

Les électrodes et la strip sont séparées par un morceau de papier (Whatman). La machine (système protean 3) est programmée suivant le protocole du Tableau 7.

Tableau 7: Protocole de focalisation

| | Voltage à atteindre | Montée | Durée | Température |
|---------|---------------------|-------------|----------------|-------------|
| Etape 1 | 250 V | lente | 15 minutes | 20°C |
| Etape 2 | 4000 V | progressive | 2 heures | 20°C |
| Etape 3 | 4000 V | rapide | Volt par heure | 20°C |
| Etape 4 | 500 V | rapide | 5 heures | 20°C |

c. Equilibration des strips pour la deuxième dimension:

La bandelette est équilibrée dans la solution de réduction (urée 6 M, SDS 2 %, Tris HCl 0.375 M pH 8.8, glycérol 20 %, DTT 130 mM) deux fois 15 minutes sous agitation douce, puis dans la solution d'alkylation (urée 6 M, SDS 2 %, tris HCl 0.375 M pH 8.8, glycérol 20 %, iodoacétamide 135 nM) deux fois 20 minutes sous agitation douce. Cette étape permet de charger les protéines négativement pour qu'elles migrent en fonction de leur masse (SDS) et de réduire (DDT) et maintenir à l'état réduit (iodoacétamide) les ponts disulfures intra- ou inter-protéiques.

d. Deuxième dimension

Un gel de polyacrylamide de 12% est préparé. L'agarose low-melting à 0.5 % est coulé au dessus du gel pour permettre le dépôt de la bandelette. Un carré de papier Whatman est imbibé avec 5 µl de marqueur de taille (BioRad) et déposé du côté de l'anode. Le voltage appliqué est de 85V pendant 1H30, puis 100V pendant 10 minutes et enfin 120V pendant 30 minutes.

e. Coloration

Le gel est coloré au ProQ Diamond, au bleu colloïdal et enfin au nitrate d'argent suivant le protocole du

Tableau 8.

Tableau 8: Protocole de coloration

| | | Quantité | Temps |
|---------------------|--|----------|------------------------|
| Fixation | 45% méthanol 1% acide acétique | 50 ml | 30 minutes à overnight |
| Rinçage | H ₂ O MilliQ | 50 ml | 3 fois 10 minutes |
| Coloration | Pro Q Diamond | 50 ml | 2 heures à l'obscurité |
| Acquisition d'image | Ettan DIGE IMAGER | | |
| Décoloration | Acétonitrile 20% Sodium acétate 50mM pH4 | 50 ml | 2 fois 10 minutes |
| Rinçage | H ₂ O MilliQ | 50 ml | 3 fois 10 minutes |
| Coloration | Méthanol 34% Sulfate d'ammonium 17% Acide acétique 0.5% Bleu G250 0.1% | 50 ml | Over night |
| Rinçage | H ₂ O MilliQ (50 °C) | 50 ml | 4 à 5 fois 10 minutes |
| Acquisition d'image | Ettan DIGE IMAGER | | |
| Lavage | H ₂ O MilliQ | 50 ml | 3 fois 10 minutes |
| Sensibilisation | DTT 0.005 g/L | 50 ml | 20 minutes |
| Coloration | Nitrate d'argent 0.1% | 50 ml | 20 minutes |
| Lavage | H ₂ O MilliQ | 50 ml | 3 fois 10 minutes |
| Révélation | 30g de bicarbonate de soude et 600 µl de formaldéhyde, H ₂ O qsp 1L | 50 ml | |
| Arrêt | Acide acétique 10% | 25 ml | 10 minutes |
| Lavage | H ₂ O MilliQ | 50 ml | 3 fois 10 minutes |
| Acquisition d'image | Ettan DIGE IMAGER | | |

Le gel peut être conservé à 4°C dans du sulfate d'ammonium 20%. Le découpage des spots d'intérêt est effectué par le Spot Picker et l'analyse se fait par spectrométrie de masse (collaboration Philippe Hamman, plateforme protéomique de l'Institut de Biologie moléculaire et cellulaire, Strasbourg).

B. Mutagenèse dirigée

Les mutations silencieuses dans la séquence codante pour Rad18 dans le plasmide pcDNA HA-Rad18 ont été générées par mutagenèse dirigée à l'aide des oligonucléotides suivants:

- 5'AATAAAAGGAATAGGAATTAAGGATCC3'

- 5'ACGAGGCTCAATCTCAGCACTTTC3'.

Ces mutations (en rouge) ont permis l'expression de ce plasmide, renommé pcDNA HA-Rad18* dans la lignée MRC5-Rad18^{KD} malgré la présence du shRNA dirigé contre Rad18.

Les mutations T58A, S368A et S403A dans la séquence codante pour Rad18 dans le plasmide pcDNA HA-Rad18* ont été générés par mutagenèse dirigée à l'aide des oligonucléotides suivants:

- T58A: séquences des oligonucléotides: 5'**GCT**TAAACTCAGTGTCCA**ACTTGC**3';
5'**GCT**CAGAAATTTCTTATACAGAG3'

-S368A: séquences des oligonucléotides: 5'GG**CATGG**CACAAAAACAGTAACA3';
5'**GGCA**ATTTCTTGTATCCTTTTCT3'

-S403A: séquence des oligonucléotides: 5'**CTT**GACTCCCCAGAGGAATTGGAA3';
5'**CTTTG**ATTGAGCAAAGTGGTTTGT3'

Les oligonucléotides ont été conçus de telle sorte que des sites de restriction uniques ou peu fréquents soient créés (site AfeI, site NaeI et site HindIII respectivement). Il nous a été alors possible de vérifier par digestion enzymatique le profil des ADN plasmidiques des différents clones. La séquence de l'ADN plasmidique a aussi été vérifiée par séquençage.

BIBLIOGRAPHIE

- Abbas, T., U. Sivaprasad, K. Terai, V. Amador, M. Pagano, and A. Dutta. 2008. PCNA-dependent regulation of p21 ubiquitylation and degradation via the CRL4Cdt2 ubiquitin ligase complex. *Genes Dev.* 22:2496-506.
- Abraham, R.T. 2001. Cell cycle checkpoint signaling through the ATM and ATR kinases. *Genes Dev.* 15:2177-96.
- Acharya, N., A. Brahma, L. Haracska, L. Prakash, and S. Prakash. 2007. Mutations in the ubiquitin binding UBZ motif of DNA polymerase eta do not impair its function in translesion synthesis during replication. *Mol Cell Biol.* 27:7266-72.
- Acharya, N., R.E. Johnson, S. Prakash, and L. Prakash. 2006. Complex formation with Rev1 enhances the proficiency of *Saccharomyces cerevisiae* DNA polymerase zeta for mismatch extension and for extension opposite from DNA lesions. *Mol Cell Biol.* 26:9555-63.
- Acharya, N., J.H. Yoon, H. Gali, I. Unk, L. Haracska, R.E. Johnson, J. Hurwitz, L. Prakash, and S. Prakash. 2008. Roles of PCNA-binding and ubiquitin-binding domains in human DNA polymerase eta in translesion DNA synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 105:17724-9.
- Adams, M.M., and P.B. Carpenter. 2006. Tying the loose ends together in DNA double strand break repair with 53BP1. *Cell Div.* 1:19.
- Akagi, J., C. Masutani, Y. Kataoka, T. Kan, E. Ohashi, T. Mori, H. Ohmori, and F. Hanaoka. 2009. Interaction with DNA polymerase eta is required for nuclear accumulation of REV1 and suppression of spontaneous mutations in human cells. *DNA Repair (Amst).* 8:585-99.
- Albertella, M.R., C.M. Green, A.R. Lehmann, and M.J. O'Connor. 2005. A role for polymerase eta in the cellular tolerance to cisplatin-induced damage. *Cancer Res.* 65:9799-806.
- Alcasabas, A.A., A.J. Osborn, J. Bachant, F. Hu, P.J. Werler, K. Bousset, K. Furuya, J.F. Diffley, A.M. Carr, and S.J. Elledge. 2001. Mrc1 transduces signals of DNA replication stress to activate Rad53. *Nat Cell Biol.* 3:958-65.
- Allen, J.B., Z. Zhou, W. Siede, E.C. Friedberg, and S.J. Elledge. 1994. The SAD1/RAD53 protein kinase controls multiple checkpoints and DNA damage-induced transcription in yeast. *Genes Dev.* 8:2401-15.
- Andersen, P.L., F. Xu, and W. Xiao. 2008. Eukaryotic DNA damage tolerance and translesion synthesis through covalent modifications of PCNA. *Cell Res.* 18:162-73.
- Arakawa, H., G.L. Moldovan, H. Saribasak, N.N. Saribasak, S. Jentsch, and J.M. Buerstedde. 2006. A role for PCNA ubiquitination in immunoglobulin hypermutation. *PLoS Biol.* 4:e366.
- Arana, M.E., M. Seki, R.D. Wood, I.B. Rogozin, and T.A. Kunkel. 2008. Low-fidelity DNA synthesis by human DNA polymerase theta. *Nucleic Acids Res.* 36:3847-56.
- Aravind, L., and E.V. Koonin. 1998. The HORMA domain: a common structural denominator in mitotic checkpoints, chromosome synapsis and DNA repair. *Trends Biochem Sci.* 23:284-6.
- Aravind, L., and E.V. Koonin. 2000. SAP - a putative DNA-binding motif involved in chromosomal organization. *Trends Biochem Sci.* 25:112-4.
- Arias, E.E., and J.C. Walter. 2006. PCNA functions as a molecular platform to trigger Cdt1 destruction and prevent re-replication. *Nat Cell Biol.* 8:84-90.
- Arlett, C.F., S.A. Harcourt, and B.C. Broughton. 1975. The influence of caffeine on cell survival in excision-proficient and excision-deficient xeroderma pigmentosum and normal human cell strains following ultraviolet-light irradiation. *Mutat Res.* 33:341-6.
- Armstrong, J.D., D.N. Chadee, and B.A. Kunz. 1994. Roles for the yeast RAD18 and RAD52 DNA repair genes in UV mutagenesis. *Mutat Res.* 315:281-93.
- Aroya, S.B., and M. Kupiec. 2005. The Elg1 replication factor C-like complex: a novel guardian of genome stability. *DNA Repair (Amst).* 4:409-17.

- Arunkumar, A.I., M.E. Stauffer, E. Bochkareva, A. Bochkarev, and W.J. Chazin. 2003. Independent and coordinated functions of replication protein A tandem high affinity single-stranded DNA binding domains. *J Biol Chem.* 278:41077-82.
- Avkin, S., M. Goldsmith, S. Velasco-Miguel, N. Geacintov, E.C. Friedberg, and Z. Livneh. 2004. Quantitative analysis of translesion DNA synthesis across a benzo[a]pyrene-guanine adduct in mammalian cells: the role of DNA polymerase kappa. *J Biol Chem.* 279:53298-305.
- Avkin, S., Z. Sevilya, L. Toube, N. Geacintov, S.G. Chaney, M. Oren, and Z. Livneh. 2006. p53 and p21 regulate error-prone DNA repair to yield a lower mutation load. *Mol Cell.* 22:407-13.
- Baarends, W.M., R. van der Laan, and J.A. Grootegeod. 2000. Specific aspects of the ubiquitin system in spermatogenesis. *J Endocrinol Invest.* 23:597-604.
- Back, J.W., V. Notenboom, L.J. de Koning, A.O. Muijsers, T.K. Sixma, C.G. de Koster, and L. de Jong. 2002. Identification of cross-linked peptides for protein interaction studies using mass spectrometry and 18O labeling. *Anal Chem.* 74:4417-22.
- Bailly, V., J. Lamb, P. Sung, S. Prakash, and L. Prakash. 1994. Specific complex formation between yeast RAD6 and RAD18 proteins: a potential mechanism for targeting RAD6 ubiquitin-conjugating activity to DNA damage sites. *Genes Dev.* 8:811-20.
- Bailly, V., S. Prakash, and L. Prakash. 1997. Domains required for dimerization of yeast Rad6 ubiquitin-conjugating enzyme and Rad18 DNA binding protein. *Mol Cell Biol.* 17:4536-43.
- Bakkenist, C.J., and M.B. Kastan. 2003. DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation. *Nature.* 421:499-506.
- Banin, S., L. Moyal, S. Shieh, Y. Taya, C.W. Anderson, L. Chessa, N.I. Smorodinsky, C. Prives, Y. Reiss, Y. Shiloh, and Y. Ziv. 1998. Enhanced phosphorylation of p53 by ATM in response to DNA damage. *Science.* 281:1674-7.
- Baran, N., A. Lapidot, and H. Manor. 1991. Formation of DNA triplexes accounts for arrests of DNA synthesis at d(TC)n and d(GA)n tracts. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 88:507-11.
- Barber, L., Youds, J., Ward, J., McIlwraith, M., O'Neil, N., Petalcorin, M., Martin, J., Collis, S., Cantor, S., Auclair, M., Tissenbaum, H., West, S., Rose A. and Boulton, S. 2008. RTEL1 Maintains Genomic Stability by Suppressing Homologous Recombination. *Cell.* 135: 261-271.
- Bassett, E., N.M. King, M.F. Bryant, S. Hector, L. Pendyala, S.G. Chaney, and M. Cordeiro-Stone. 2004. The role of DNA polymerase eta in translesion synthesis past platinum-DNA adducts in human fibroblasts. *Cancer Res.* 64:6469-75.
- Bavoux, C., J.S. Hoffmann, and C. Cazaux. 2005. Adaptation to DNA damage and stimulation of genetic instability: the double-edged sword mammalian DNA polymerase kappa. *Biochimie.* 87:637-46.
- Beausoleil, S.A., M. Jedrychowski, D. Schwartz, J.E. Elias, J. Villen, J. Li, M.A. Cohn, L.C. Cantley, and S.P. Gygi. 2004. Large-scale characterization of HeLa cell nuclear phosphoproteins. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101:12130-5.
- Bedinger, P., M. Munn, and B.M. Alberts. 1989. Sequence-specific pausing during in vitro DNA replication on double-stranded DNA templates. *J Biol Chem.* 264:16880-6.
- Bemark, M., A.A. Khamlichi, S.L. Davies, and M.S. Neuberger. 2000. Disruption of mouse polymerase zeta (Rev3) leads to embryonic lethality and impairs blastocyst development in vitro. *Curr Biol.* 10:1213-6.
- Bendjennat, M., J. Boulaire, T. Jascur, H. Brickner, V. Barbier, A. Sarasin, A. Fotedar, and R. Fotedar. 2003. UV irradiation triggers ubiquitin-dependent degradation of p21(WAF1) to promote DNA repair. *Cell.* 114:599-610.
- Bergoglio, V., C. Bavoux, V. Verbiest, J.S. Hoffmann, and C. Cazaux. 2002. Localisation of human DNA polymerase kappa to replication foci. *J Cell Sci.* 115:4413-8.

- Bermudez, V.P., L.A. Lindsey-Boltz, A.J. Cesare, Y. Maniwa, J.D. Griffith, J. Hurwitz, and A. Sancar. 2003. Loading of the human 9-1-1 checkpoint complex onto DNA by the checkpoint clamp loader hRad17-replication factor C complex in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 100:1633-8.
- Bi, X., L.R. Barkley, D.M. Slater, S. Tateishi, M. Yamaizumi, H. Ohmori, and C. Vaziri. 2006. Rad18 regulates DNA polymerase kappa and is required for recovery from S-phase checkpoint-mediated arrest. *Mol Cell Biol*. 26:3527-40.
- Bi, X., D.M. Slater, H. Ohmori, and C. Vaziri. 2005. DNA polymerase kappa is specifically required for recovery from the benzo[a]pyrene-dihydrodiol epoxide (BPDE)-induced S-phase checkpoint. *J Biol Chem*. 280:22343-55.
- Bienko, M., C.M. Green, N. Crosetto, F. Rudolf, G. Zapart, B. Coull, P. Kannouche, G. Wider, M. Peter, A.R. Lehmann, K. Hofmann, and I. Dikic. 2005. Ubiquitin-binding domains in Y-family polymerases regulate translesion synthesis. *Science*. 310:1821-4.
- Bienko, M., C.M. Green, S. Sabbioneda, N. Crosetto, I. Matic, R.G. Hibbert, T. Begovic, A. Niimi, M. Mann, A.R. Lehmann, and I. Dikic. Regulation of translesion synthesis DNA polymerase eta by monoubiquitination. *Mol Cell*. 37:396-407.
- Blastyak, A., L. Pinter, I. Unk, L. Prakash, S. Prakash, and L. Haracska. 2007. Yeast Rad5 protein required for postreplication repair has a DNA helicase activity specific for replication fork regression. *Mol Cell*. 28:167-75.
- Bomar, M.G., M.T. Pai, S.R. Tzeng, S.S. Li, and P. Zhou. 2007. Structure of the ubiquitin-binding zinc finger domain of human DNA Y-polymerase eta. *EMBO Rep*. 8:247-51.
- Bomgardner, R.D., P.J. Lupardus, D.V. Soni, M.C. Yee, J.M. Ford, and K.A. Cimprich. 2006. Opposing effects of the UV lesion repair protein XPA and UV bypass polymerase eta on ATR checkpoint signaling. *Embo J*. 25:2605-14.
- Boudsocq, F., R.J. Kokoska, B.S. Plosky, A. Vaisman, H. Ling, T.A. Kunkel, W. Yang, and R. Woodgate. 2004. Investigating the role of the little finger domain of Y-family DNA polymerases in low fidelity synthesis and translesion replication. *J Biol Chem*. 279:32932-40.
- Branzei, D., and M. Foiani. 2005. The DNA damage response during DNA replication. *Curr Opin Cell Biol*. 17:568-75.
- Brinton, B.T., M.S. Caddle, and N.H. Heintz. 1991. Position and orientation-dependent effects of a eukaryotic Z-triplex DNA motif on episomal DNA replication in COS-7 cells. *J Biol Chem*. 266:5153-61.
- Broomfield, S., B.L. Chow, and W. Xiao. 1998. MMS2, encoding a ubiquitin-conjugating-enzyme-like protein, is a member of the yeast error-free postreplication repair pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 95:5678-83.
- Broughton, B.C., A. Cordonnier, W.J. Kleijer, N.G. Jaspers, H. Fawcett, A. Raams, V.H. Garritsen, A. Stary, M.F. Avril, F. Boudsocq, C. Masutani, F. Hanaoka, R.P. Fuchs, A. Sarasin, and A.R. Lehmann. 2002. Molecular analysis of mutations in DNA polymerase eta in xeroderma pigmentosum-variant patients. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 99:815-20.
- Brown, K.D., T.A. Lataxes, S. Shangary, J.L. Mannino, J.F. Giardina, J. Chen, and R. Baskaran. 2000. Ionizing radiation exposure results in up-regulation of Ku70 via a p53/ataxia-telangiectasia-mutated protein-dependent mechanism. *J Biol Chem*. 275:6651-6.
- Brun, J., R. Chiu, K. Lockhart, W. Xiao, B.G. Wouters, and D.A. Gray. 2008. hMMS2 serves a redundant role in human PCNA polyubiquitination. *BMC Mol Biol*. 9:24.
- Brun, J., R.K. Chiu, B.G. Wouters, and D.A. Gray. Regulation of PCNA polyubiquitination in human cells. *BMC Res Notes*. 3:85.
- Bruning, J.B., and Y. Shamoo. 2004. Structural and thermodynamic analysis of human PCNA with peptides derived from DNA polymerase-delta p66 subunit and flap endonuclease-1. *Structure*. 12:2209-19.

- Brunn, G.J., C.C. Hudson, A. Sekulic, J.M. Williams, H. Hosoi, P.J. Houghton, J.C. Lawrence, Jr., and R.T. Abraham. 1997. Phosphorylation of the translational repressor PHAS-I by the mammalian target of rapamycin. *Science*. 277:99-101.
- Brush, G.S., C.W. Anderson, and T.J. Kelly. 1994. The DNA-activated protein kinase is required for the phosphorylation of replication protein A during simian virus 40 DNA replication. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 91:12520-4.
- Brusky, J., Y. Zhu, and W. Xiao. 2000. UBC13, a DNA-damage-inducible gene, is a member of the error-free postreplication repair pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Genet*. 37:168-74.
- Bugreev, D.V., X. Yu, E.H. Egelman, and A.V. Mazin. 2007. Novel pro- and anti-recombination activities of the Bloom's syndrome helicase. *Genes Dev*. 21:3085-94.
- Burns, N., B. Grimwade, P.B. Ross-Macdonald, E.Y. Choi, K. Finberg, G.S. Roeder, and M. Snyder. 1994. Large-scale analysis of gene expression, protein localization, and gene disruption in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev*. 8:1087-105.
- Burns, T.F., and W.S. El-Deiry. 2003. Microarray analysis of p53 target gene expression patterns in the spleen and thymus in response to ionizing radiation. *Cancer Biol Ther*. 2:431-43.
- Byun, T.S., M. Pacek, M.C. Yee, J.C. Walter, and K.A. Cimprich. 2005. Functional uncoupling of MCM helicase and DNA polymerase activities activates the ATR-dependent checkpoint. *Genes Dev*. 19:1040-52.
- Cadet, J., V.M. Carvalho, J. Onuki, T. Douki, M.H. Medeiros, and P.D. Di Mascio. 1999. Purine DNA adducts of 4,5-dioxovaleric acid and 2,4-decadienal. *LARC Sci Publ*:103-13.
- Cai, J., E. Gibbs, F. Uhlmann, B. Phillips, N. Yao, M. O'Donnell, and J. Hurwitz. 1997. A complex consisting of human replication factor C p40, p37, and p36 subunits is a DNA-dependent ATPase and an intermediate in the assembly of the holoenzyme. *J Biol Chem*. 272:18974-81.
- Callebaut, I., and J.P. Mornon. 1997. From BRCA1 to RAP1: a widespread BRCT module closely associated with DNA repair. *FEBS Lett*. 400:25-30.
- Cassier-Chauvat, C., and F. Fabre. 1991. A similar defect in UV-induced mutagenesis conferred by the rad6 and rad18 mutations of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mutat Res*. 254:247-53.
- Chan, D.W., R. Ye, C.J. Veillette, and S.P. Lees-Miller. 1999. DNA-dependent protein kinase phosphorylation sites in Ku 70/80 heterodimer. *Biochemistry*. 38:1819-28.
- Chang, D.J., and K.A. Cimprich. 2009. DNA damage tolerance: when it's OK to make mistakes. *Nat Chem Biol*. 5:82-90.
- Chang, D.J., P.J. Lupardus, and K.A. Cimprich. 2006. Monoubiquitination of proliferating cell nuclear antigen induced by stalled replication requires uncoupling of DNA polymerase and mini-chromosome maintenance helicase activities. *J Biol Chem*. 281:32081-8.
- Chapman, J.D., A.P. Reuvers, J. Borsa, and C.L. Greenstock. 1973. Chemical radioprotection and radiosensitization of mammalian cells growing in vitro. *Radiat Res*. 56:291-306.
- Chen, I.T., M. Akamatsu, M.L. Smith, F.D. Lung, D. Duba, P.P. Roller, A.J. Fornace, Jr., and P.M. O'Connor. 1996. Characterization of p21Cip1/Waf1 peptide domains required for cyclin E/Cdk2 and PCNA interaction. *Oncogene*. 12:595-607.
- Chen, Y.W., J.E. Cleaver, F. Hanaoka, C.F. Chang, and K.M. Chou. 2006. A novel role of DNA polymerase eta in modulating cellular sensitivity to chemotherapeutic agents. *Mol Cancer Res*. 4:257-65.
- Chen, Y.W., J.E. Cleaver, Z. Hatahet, R.E. Honkanen, J.Y. Chang, Y. Yen, and K.M. Chou. 2008. Human DNA polymerase eta activity and translocation is regulated by phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 105:16578-83.
- Cheung, H.W., A.C. Chun, Q. Wang, W. Deng, L. Hu, X.Y. Guan, J.M. Nicholls, M.T. Ling, Y. Chuan Wong, S.W. Tsao, D.Y. Jin, and X. Wang. 2006. Inactivation of human MAD2B in nasopharyngeal carcinoma cells leads to chemosensitization to DNA-damaging agents. *Cancer Res*. 66:4357-67.

- Chiapperino, D., H. Kroth, I.H. Kramarczuk, J.M. Sayer, C. Masutani, F. Hanaoka, D.M. Jerina, and A.M. Cheh. 2002. Preferential misincorporation of purine nucleotides by human DNA polymerase ϵ opposite benzo[a]pyrene 7,8-diol 9,10-epoxide deoxyguanosine adducts. *J Biol Chem.* 277:11765-71.
- Chiolo, I., M. Saponaro, A. Baryshnikova, J.H. Kim, Y.S. Seo, and G. Liberi. 2007. The human F-Box DNA helicase FBH1 faces *Saccharomyces cerevisiae* Srs2 and postreplication repair pathway roles. *Mol Cell Biol.* 27:7439-50.
- Chiu, R.K., J. Brun, C. Ramaekers, J. Theys, L. Weng, P. Lambin, D.A. Gray, and B.G. Wouters. 2006. Lysine 63-polyubiquitination guards against translesion synthesis-induced mutations. *PLoS Genet.* 2:e116.
- Chu, S., J. DeRisi, M. Eisen, J. Mulholland, D. Botstein, P.O. Brown, and I. Herskowitz. 1998. The transcriptional program of sporulation in budding yeast. *Science.* 282:699-705.
- Cimprich, K.A., and D. Cortez. 2008. ATR: an essential regulator of genome integrity. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 9:616-27.
- Cimprich, K.A., T.B. Shin, C.T. Keith, and S.L. Schreiber. 1996. cDNA cloning and gene mapping of a candidate human cell cycle checkpoint protein. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 93:2850-5.
- Clark, D.R., W. Zacharias, L. Panaitescu, and W.G. McGregor. 2003. Ribozyme-mediated REV1 inhibition reduces the frequency of UV-induced mutations in the human HPRT gene. *Nucleic Acids Res.* 31:4981-8.
- Cleaver, J.E. 1972. Xeroderma pigmentosum: variants with normal DNA repair and normal sensitivity to ultraviolet light. *J Invest Dermatol.* 58:124-8.
- Cleaver, J.E., and D. Bootsma. 1975. Xeroderma pigmentosum: biochemical and genetic characteristics. *Annu Rev Genet.* 9:19-38.
- Clingen, P.H., C.F. Arlett, L. Roza, T. Mori, O. Nikaido, and M.H. Green. 1995. Induction of cyclobutane pyrimidine dimers, pyrimidine(6-4)pyrimidone photoproducts, and Dewar valence isomers by natural sunlight in normal human mononuclear cells. *Cancer Res.* 55:2245-8.
- Cobb, J.A., K. Shimada, and S.M. Gasser. 2004. Redundancy, insult-specific sensors and thresholds: unlocking the S-phase checkpoint response. *Curr Opin Genet Dev.* 14:292-300.
- Cohn, M.A., P. Kowal, K. Yang, W. Haas, T.T. Huang, S.P. Gygi, and A.D. D'Andrea. 2007. A UAF1-containing multisubunit protein complex regulates the Fanconi anemia pathway. *Mol Cell.* 28:786-97.
- Collins, N.S., S. Bhattacharyya, and R.S. Lahue. 2007. Rev1 enhances CAG/CTG repeat stability in *Saccharomyces cerevisiae*. *DNA Repair (Amst).* 6:38-44.
- Cooper, M.P., A.S. Balajee, and V.A. Bohr. 1999. The C-terminal domain of p21 inhibits nucleotide excision repair In vitro and In vivo. *Mol Biol Cell.* 10:2119-29.
- Cordeiro-Stone, M., L.S. Zaritskaya, L.K. Price, and W.K. Kaufmann. 1997. Replication fork bypass of a pyrimidine dimer blocking leading strand DNA synthesis. *J Biol Chem.* 272:13945-54.
- Cordonnier, A.M., A.R. Lehmann, and R.P. Fuchs. 1999. Impaired translesion synthesis in xeroderma pigmentosum variant extracts. *Mol Cell Biol.* 19:2206-11.
- Cotta-Ramusino, C., D. Fachinetti, C. Lucca, Y. Doksani, M. Lopes, J. Sogo, and M. Foiani. 2005. Exo1 processes stalled replication forks and counteracts fork reversal in checkpoint-defective cells. *Mol Cell.* 17:153-9.
- Cox, B.S., and J.M. Parry. 1968. The isolation, genetics and survival characteristics of ultraviolet light-sensitive mutants in yeast. *Mutat Res.* 6:37-55.
- Cui, X., Y. Yu, S. Gupta, Y.M. Cho, S.P. Lees-Miller, and K. Meek. 2005. Autophosphorylation of DNA-dependent protein kinase regulates DNA end processing and may also alter double-strand break repair pathway choice. *Mol Cell Biol.* 25:10842-52.

- D'Souza, S., and G.C. Walker. 2006. Novel role for the C terminus of *Saccharomyces cerevisiae* Rev1 in mediating protein-protein interactions. *Mol Cell Biol.* 26:8173-82.
- D'Souza, S., L.S. Waters, and G.C. Walker. 2008. Novel conserved motifs in Rev1 C-terminus are required for mutagenic DNA damage tolerance. *DNA Repair (Amst).* 7:1455-70.
- Das-Bradoo, S., H.D. Nguyen, J.L. Wood, R.M. Ricke, J.C. Haworth, and A.K. Bielinsky. Defects in DNA ligase I trigger PCNA ubiquitylation at Lys 107. *Nat Cell Biol.* 12:74-9; sup pp 1-20.
- Davies, A.A., D. Huttner, Y. Daigaku, S. Chen, and H.D. Ulrich. 2008. Activation of ubiquitin-dependent DNA damage bypass is mediated by replication protein a. *Mol Cell.* 29:625-36.
- Davies, S.L., P.S. North, A. Dart, N.D. Lakin, and I.D. Hickson. 2004. Phosphorylation of the Bloom's syndrome helicase and its role in recovery from S-phase arrest. *Mol Cell Biol.* 24:1279-91.
- Dayn, A., G.M. Samadashwily, and S.M. Mirkin. 1992. Intramolecular DNA triplexes: unusual sequence requirements and influence on DNA polymerization. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 89:11406-10.
- Delbos, F., S. Aoufouchi, A. Faili, J.C. Weill, and C.A. Reynaud. 2007. DNA polymerase eta is the sole contributor of A/T modifications during immunoglobulin gene hypermutation in the mouse. *J Exp Med.* 204:17-23.
- Delbos, F., A. De Smet, A. Faili, S. Aoufouchi, J.C. Weill, and C.A. Reynaud. 2005. Contribution of DNA polymerase eta to immunoglobulin gene hypermutation in the mouse. *J Exp Med.* 201:1191-6.
- Desany, B.A., A.A. Alcasabas, J.B. Bachant, and S.J. Elledge. 1998. Recovery from DNA replicational stress is the essential function of the S-phase checkpoint pathway. *Genes Dev.* 12:2956-70.
- Despras, E., F. Daboussi, O. Hyrien, K. Marheineke, and P.L. Kannouche. ATR/Chk1 pathway is essential for resumption of DNA synthesis and cell survival in UV-irradiated XP variant cells. *Hum Mol Genet.* 19:1690-701.
- Ding, Q., Y.V. Reddy, W. Wang, T. Woods, P. Douglas, D.A. Ramsden, S.P. Lees-Miller, and K. Meek. 2003. Autophosphorylation of the catalytic subunit of the DNA-dependent protein kinase is required for efficient end processing during DNA double-strand break repair. *Mol Cell Biol.* 23:5836-48.
- Dizdaroglu, M. 1992. Measurement of radiation-induced damage to DNA at the molecular level. *Int J Radiat Biol.* 61:175-83.
- Dizdaroglu, M., Z. Nackerdien, B.C. Chao, E. Gajewski, and G. Rao. 1991. Chemical nature of in vivo DNA base damage in hydrogen peroxide-treated mammalian cells. *Arch Biochem Biophys.* 285:388-90.
- Doherty, K.M., S. Sharma, L.A. Uzdilla, T.M. Wilson, S. Cui, A. Vindigni, and R.M. Brosh, Jr. 2005. RECQ1 helicase interacts with human mismatch repair factors that regulate genetic recombination. *J Biol Chem.* 280:28085-94.
- Dohmen, R.J., K. Madura, B. Bartel, and A. Varshavsky. 1991. The N-end rule is mediated by the UBC2(RAD6) ubiquitin-conjugating enzyme. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 88:7351-5.
- Dumstorf, C.A., A.B. Clark, Q. Lin, G.E. Kissling, T. Yuan, R. Kucherlapati, W.G. McGregor, and T.A. Kunkel. 2006. Participation of mouse DNA polymerase iota in strand-biased mutagenic bypass of UV photoproducts and suppression of skin cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103:18083-8.
- Edmunds, C.E., L.J. Simpson, and J.E. Sale. 2008. PCNA ubiquitination and REV1 define temporally distinct mechanisms for controlling translesion synthesis in the avian cell line DT40. *Mol Cell.* 30:519-29.
- Efeyan, A., and M. Serrano. 2007. p53: guardian of the genome and policeman of the oncogenes. *Cell Cycle.* 6:1006-10.

- Ekholm, S.V., and S.I. Reed. 2000. Regulation of G(1) cyclin-dependent kinases in the mammalian cell cycle. *Curr Opin Cell Biol.* 12:676-84.
- Ellenberger, T., and A.E. Tomkinson. 2008. Eukaryotic DNA ligases: structural and functional insights. *Annu Rev Biochem.* 77:313-38.
- Ellis, N.A., J. Groden, T.Z. Ye, J. Straughen, D.J. Lennon, S. Giocci, M. Proytcheva, and J. German. 1995. The Bloom's syndrome gene product is homologous to RecQ helicases. *Cell.* 83:655-66.
- Ellison, V., and B. Stillman. 2003. Biochemical characterization of DNA damage checkpoint complexes: clamp loader and clamp complexes with specificity for 5' recessed DNA. *PLoS Biol.* 1:E33.
- Ensch-Simon, I., P.M. Burgers, and J.S. Taylor. 1998. Bypass of a site-specific cis-Syn thymine dimer in an SV40 vector during in vitro replication by HeLa and XPV cell-free extracts. *Biochemistry.* 37:8218-26.
- Esposito, G., I. Godindagger, U. Klein, M.L. Yaspo, A. Cumano, and K. Rajewsky. 2000. Disruption of the Rev3l-encoded catalytic subunit of polymerase zeta in mice results in early embryonic lethality. *Curr Biol.* 10:1221-4.
- Essers, J., A.F. Theil, C. Baldeyron, W.A. van Cappellen, A.B. Houtsmuller, R. Kanaar, and W. Vermeulen. 2005. Nuclear dynamics of PCNA in DNA replication and repair. *Mol Cell Biol.* 25:9350-9.
- Fabre, F., N. Magana-Schwencke, and R. Chanet. 1989. Isolation of the RAD18 gene of *Saccharomyces cerevisiae* and construction of rad18 deletion mutants. *Mol Gen Genet.* 215:425-30.
- Faili, A., S. Aoufouchi, E. Flatter, Q. Gueranger, C.A. Reynaud, and J.C. Weill. 2002. Induction of somatic hypermutation in immunoglobulin genes is dependent on DNA polymerase iota. *Nature.* 419:944-7.
- Faili, A., S. Aoufouchi, S. Weller, F. Vuillier, A. Sary, A. Sarasin, C.A. Reynaud, and J.C. Weill. 2004. DNA polymerase eta is involved in hypermutation occurring during immunoglobulin class switch recombination. *J Exp Med.* 199:265-70.
- Faili, A., A. Sary, F. Delbos, S. Weller, S. Aoufouchi, A. Sarasin, J.C. Weill, and C.A. Reynaud. 2009. A backup role of DNA polymerase kappa in Ig gene hypermutation only takes place in the complete absence of DNA polymerase eta. *J Immunol.* 182:6353-9.
- Fanning, E., V. Klimovich, and A.R. Nager. 2006. A dynamic model for replication protein A (RPA) function in DNA processing pathways. *Nucleic Acids Res.* 34:4126-37.
- Finkel, T., and N.J. Holbrook. 2000. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature.* 408:239-47.
- Fischhaber, P.L., V.L. Gerlach, W.J. Feaver, Z. Hatahet, S.S. Wallace, and E.C. Friedberg. 2002. Human DNA polymerase kappa bypasses and extends beyond thymine glycols during translesion synthesis in vitro, preferentially incorporating correct nucleotides. *J Biol Chem.* 277:37604-11.
- Fortini, P., B. Pascucci, E. Parlanti, M. D'Errico, V. Simonelli, and E. Dogliotti. 2003. 8-Oxoguanine DNA damage: at the crossroad of alternative repair pathways. *Mutat Res.* 531:127-39.
- Frampton, J., A. Irmisch, C.M. Green, A. Neiss, M. Trickey, H.D. Ulrich, K. Furuya, F.Z. Watts, A.M. Carr, and A.R. Lehmann. 2006. Postreplication repair and PCNA modification in *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol Biol Cell.* 17:2976-85.
- Freudenthal, B.D., S. Ramaswamy, M.M. Hingorani, and M.T. Washington. 2008. Structure of a Mutant Form of Proliferating Cell Nuclear Antigen That Blocks Translesion DNA Synthesis (dagger) (double dagger). *Biochemistry.*
- Friedberg, E.C. 2005. Suffering in silence: the tolerance of DNA damage. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 6:943-53.

- Friedberg, E.C., A.R. Lehmann, and R.P. Fuchs. 2005. Trading places: how do DNA polymerases switch during translesion DNA synthesis? *Mol Cell*. 18:499-505.
- Friedberg, E.C., R. Wagner, and M. Radman. 2002. Specialized DNA polymerases, cellular survival, and the genesis of mutations. *Science*. 296:1627-30.
- Fu, Y., Y. Zhu, K. Zhang, M. Yeung, D. Durocher, and W. Xiao. 2008. Rad6-Rad18 mediates a eukaryotic SOS response by ubiquitinating the 9-1-1 checkpoint clamp. *Cell*. 133:601-11.
- Fuchs, R.P., and M.P. Daune. 1974. Dynamic structure of DNA modified with the carcinogen N-acetoxy-n-2-acetylaminofluorene. *Biochemistry*. 13:4435-40.
- Fuchs, R.P., J.F. Lefevre, J. Pouyet, and M.P. Daune. 1976. Comparative orientation of the fluorene residue in native DNA modified by N-acetoxy-N-2-acetylaminofluorene and two 7-halogeno derivatives. *Biochemistry*. 15:3347-51.
- Fugger, K., M. Mistrik, J.R. Danielsen, C. Dinant, J. Falck, J. Bartek, J. Lukas, and N. Mailand. 2009. Human Fbh1 helicase contributes to genome maintenance via pro- and anti-recombinase activities. *J Cell Biol*. 186:655-63.
- Fukui, T., K. Yamauchi, T. Muroya, M. Akiyama, H. Maki, A. Sugino, and S. Waga. 2004. Distinct roles of DNA polymerases delta and epsilon at the replication fork in *Xenopus* egg extracts. *Genes Cells*. 9:179-91.
- Gangavarapu, V., S. Prakash, and L. Prakash. 2007. Requirement of RAD52 group genes for postreplication repair of UV-damaged DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*. 27:7758-64.
- Garg, P., and P.M. Burgers. 2005a. DNA polymerases that propagate the eukaryotic DNA replication fork. *Crit Rev Biochem Mol Biol*. 40:115-28.
- Garg, P., and P.M. Burgers. 2005b. Ubiquitinated proliferating cell nuclear antigen activates translesion DNA polymerases eta and REV1. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 102:18361-6.
- Garg, P., C.M. Stith, J. Majka, and P.M. Burgers. 2005. Proliferating cell nuclear antigen promotes translesion synthesis by DNA polymerase zeta. *J Biol Chem*. 280:23446-50.
- Garg, P., C.M. Stith, N. Sabouri, E. Johansson, and P.M. Burgers. 2004. Idling by DNA polymerase delta maintains a ligatable nick during lagging-strand DNA replication. *Genes Dev*. 18:2764-73.
- Gary, R., D.L. Ludwig, H.L. Cornelius, M.A. MacInnes, and M.S. Park. 1997. The DNA repair endonuclease XPG binds to proliferating cell nuclear antigen (PCNA) and shares sequence elements with the PCNA-binding regions of FEN-1 and cyclin-dependent kinase inhibitor p21. *J Biol Chem*. 272:24522-9.
- Gerlach, V.L., L. Aravind, G. Gotway, R.A. Schultz, E.V. Koonin, and E.C. Friedberg. 1999. Human and mouse homologs of *Escherichia coli* DinB (DNA polymerase IV), members of the UmuC/DinB superfamily. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 96:11922-7.
- Gerlach, V.L., W.J. Feaver, P.L. Fischhaber, and E.C. Friedberg. 2001. Purification and characterization of pol kappa, a DNA polymerase encoded by the human DINB1 gene. *J Biol Chem*. 276:92-8.
- Gibbs, P.E., X.D. Wang, Z. Li, T.P. McManus, W.G. McGregor, C.W. Lawrence, and V.M. Maher. 2000. The function of the human homolog of *Saccharomyces cerevisiae* REV1 is required for mutagenesis induced by UV light. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 97:4186-91.
- Glover, J.N., R.S. Williams, and M.S. Lee. 2004. Interactions between BRCT repeats and phosphoproteins: tangled up in two. *Trends Biochem Sci*. 29:579-85.
- Gohler, T., I.M. Munoz, J. Rouse, and J.J. Blow. 2008. PTIP/Swift is required for efficient PCNA ubiquitination in response to DNA damage. *DNA Repair (Amst)*. 7:775-87.
- Goodarzi, A.A., J.C. Jonnalagadda, P. Douglas, D. Young, R. Ye, G.B. Moorhead, S.P. Lees-Miller, and K.K. Khanna. 2004. Autophosphorylation of ataxia-telangiectasia mutated is regulated by protein phosphatase 2A. *Embo J*. 23:4451-61.
- Goodman, M.F. 2002. Error-prone repair DNA polymerases in prokaryotes and eukaryotes. *Annu Rev Biochem*. 71:17-50.

- Gotter, A.L., C. Suppa, and B.S. Emanuel. 2007. Mammalian TIMELESS and Tipin are evolutionarily conserved replication fork-associated factors. *J Mol Biol.* 366:36-52.
- Grollman, A.P., and M. Moriya. 1993. Mutagenesis by 8-oxoguanine: an enemy within. *Trends Genet.* 9:246-9.
- Gu, L., Y. Hong, S. McCulloch, H. Watanabe, and G.M. Li. 1998. ATP-dependent interaction of human mismatch repair proteins and dual role of PCNA in mismatch repair. *Nucleic Acids Res.* 26:1173-8.
- Gueranger, Q., A. Stary, S. Aoufouchi, A. Faili, A. Sarasin, C.A. Reynaud, and J.C. Weill. 2008. Role of DNA polymerases eta, iota and zeta in UV resistance and UV-induced mutagenesis in a human cell line. *DNA Repair (Amst).* 7:1551-62.
- Gullo, C., M. Au, G. Feng, and G. Teoh. 2006. The biology of Ku and its potential oncogenic role in cancer. *Biochim Biophys Acta.* 1765:223-34.
- Guo, C., P.L. Fischhaber, M.J. Luk-Paszyc, Y. Masuda, J. Zhou, K. Kamiya, C. Kisker, and E.C. Friedberg. 2003. Mouse Rev1 protein interacts with multiple DNA polymerases involved in translesion DNA synthesis. *Embo J.* 22:6621-30.
- Guo, C., J.N. Kosarek-Stancel, T.S. Tang, and E.C. Friedberg. 2009. Y-family DNA polymerases in mammalian cells. *Cell Mol Life Sci.* 66:2363-81.
- Guo, C., E. Sonoda, T.S. Tang, J.L. Parker, A.B. Bielen, S. Takeda, H.D. Ulrich, and E.C. Friedberg. 2006a. REV1 protein interacts with PCNA: significance of the REV1 BRCT domain in vitro and in vivo. *Mol Cell.* 23:265-71.
- Guo, C., T.S. Tang, M. Bienko, I. Dikic, and E.C. Friedberg. 2008. Requirements for the interaction of mouse Polkappa with ubiquitin and its biological significance. *J Biol Chem.* 283:4658-64.
- Guo, C., T.S. Tang, M. Bienko, J.L. Parker, A.B. Bielen, E. Sonoda, S. Takeda, H.D. Ulrich, I. Dikic, and E.C. Friedberg. 2006b. Ubiquitin-binding motifs in REV1 protein are required for its role in the tolerance of DNA damage. *Mol Cell Biol.* 26:8892-900.
- Hammarsten, O., and G. Chu. 1998. DNA-dependent protein kinase: DNA binding and activation in the absence of Ku. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95:525-30.
- Hara, K., H. Hashimoto, Y. Murakumo, S. Kobayashi, T. Kogame, S. Unzai, S. Akashi, S. Takeda, T. Shimizu, and M. Sato. Crystal structure of human REV7 in complex with a human REV3 fragment and structural implication of the interaction between DNA polymerase zeta and REV1. *J Biol Chem.* 285:12299-307.
- Haracska, L., N. Acharya, I. Unk, R.E. Johnson, J. Hurwitz, L. Prakash, and S. Prakash. 2005. A single domain in human DNA polymerase iota mediates interaction with PCNA: implications for translesion DNA synthesis. *Mol Cell Biol.* 25:1183-90.
- Haracska, L., R.E. Johnson, I. Unk, B. Phillips, J. Hurwitz, L. Prakash, and S. Prakash. 2001a. Physical and functional interactions of human DNA polymerase eta with PCNA. *Mol Cell Biol.* 21:7199-206.
- Haracska, L., C.M. Kondratick, I. Unk, S. Prakash, and L. Prakash. 2001b. Interaction with PCNA is essential for yeast DNA polymerase eta function. *Mol Cell.* 8:407-15.
- Haracska, L., L. Prakash, and S. Prakash. 2002a. Role of human DNA polymerase kappa as an extender in translesion synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99:16000-5.
- Haracska, L., S. Prakash, and L. Prakash. 2002b. Yeast Rev1 protein is a G template-specific DNA polymerase. *J Biol Chem.* 277:15546-51.
- Haracska, L., I. Unk, R.E. Johnson, E. Johansson, P.M. Burgers, S. Prakash, and L. Prakash. 2001c. Roles of yeast DNA polymerases delta and zeta and of Rev1 in the bypass of abasic sites. *Genes Dev.* 15:945-54.
- Haracska, L., Johnson, R.E., Unk, I., Phillips, B.B., Hurwitz, J., Prakash, L. and Prakash, S. 2001d. Targeting of human DNA polymerase iota to the replication machinery via interaction with PCNA. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 98: 14256-14261.

- Haracska, L., I. Unk, L. Prakash, and S. Prakash. 2006. Ubiquitylation of yeast proliferating cell nuclear antigen and its implications for translesion DNA synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 103:6477-82.
- Haracska, L., S.L. Yu, R.E. Johnson, L. Prakash, and S. Prakash. 2000. Efficient and accurate replication in the presence of 7,8-dihydro-8-oxoguanine by DNA polymerase ϵ . *Nat Genet*. 25:458-61.
- Havens, C.G., and J.C. Walter. 2009. Docking of a specialized PIP Box onto chromatin-bound PCNA creates a degron for the ubiquitin ligase CRL4Cdt2. *Mol Cell*. 35:93-104.
- He, H., C.K. Tan, K.M. Downey, and A.G. So. 2001. A tumor necrosis factor α - and interleukin 6-inducible protein that interacts with the small subunit of DNA polymerase δ and proliferating cell nuclear antigen. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 98:11979-84.
- Helbock, H.J., K.B. Beckman, and B.N. Ames. 1999. 8-Hydroxydeoxyguanosine and 8-hydroxyguanine as biomarkers of oxidative DNA damage. *Methods Enzymol*. 300:156-66.
- Heller, R.C., and K.J. Marians. 2006. Replication fork reactivation downstream of a blocked nascent leading strand. *Nature*. 439:557-62.
- Hicks, J.K., C.L. Chute, M.T. Paulsen, R.L. Ragland, N.G. Howlett, Q. Gueranger, T.W. Glover, and C.E. Canman. Differential roles for DNA polymerases ϵ , ζ , and REV1 in lesion bypass of intrastrand versus interstrand DNA cross-links. *Mol Cell Biol*. 30:1217-30.
- Hickson, I., Y. Zhao, C.J. Richardson, S.J. Green, N.M. Martin, A.I. Orr, P.M. Reaper, S.P. Jackson, N.J. Curtin, and G.C. Smith. 2004. Identification and characterization of a novel and specific inhibitor of the ataxia-telangiectasia mutated kinase ATM. *Cancer Res*. 64:9152-9.
- Higa, L.A., D. Banks, M. Wu, R. Kobayashi, H. Sun, and H. Zhang. 2006. L2DTL/CDT2 interacts with the CUL4/DDB1 complex and PCNA and regulates CDT1 proteolysis in response to DNA damage. *Cell Cycle*. 5:1675-80.
- Hirano, Y., J. Reddy, and K. Sugimoto. 2009. Role of budding yeast Rad18 in repair of HO-induced double-strand breaks. *DNA Repair (Amst)*. 8:51-9.
- Hirano, Y., and K. Sugimoto. 2006. ATR homolog Mec1 controls association of DNA polymerase ζ -Rev1 complex with regions near a double-strand break. *Curr Biol*. 16:586-90.
- Hishida, T., H. Iwasaki, T. Ohno, T. Morishita, and H. Shinagawa. 2001. A yeast gene, MGS1, encoding a DNA-dependent AAA(+) ATPase is required to maintain genome stability. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 98:8283-9.
- Hishida, T., Y. Kubota, A.M. Carr, and H. Iwasaki. 2009. RAD6-RAD18-RAD5-pathway-dependent tolerance to chronic low-dose ultraviolet light. *Nature*. 457:612-5.
- Hishiki, A., H. Hashimoto, T. Hanafusa, K. Kamei, E. Ohashi, T. Shimizu, H. Ohmori, and M. Sato. 2009. Structural basis for novel interactions between human translesion synthesis polymerases and PCNA. *J Biol Chem*.
- Hoege, C., B. Pfander, G.L. Moldovan, G. Pyrowolakis, and S. Jentsch. 2002. RAD6-dependent DNA repair is linked to modification of PCNA by ubiquitin and SUMO. *Nature*. 419:135-41.
- Hoeijmakers, J.H. 2001. DNA repair mechanisms. *Maturitas*. 38:17-22; discussion 22-3.
- Hoffmann, J.S., M.J. Pillaire, G. Maga, V. Podust, U. Hubscher, and G. Villani. 1995. DNA polymerase β bypasses in vitro a single d(GpG)-cisplatin adduct placed on codon 13 of the HRAS gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 92:5356-60.
- Hofmann, K. 2009. Ubiquitin-binding domains and their role in the DNA damage response. *DNA Repair (Amst)*. 8:544-56.
- Holbeck, S.L., and J.N. Strathern. 1997. A role for REV3 in mutagenesis during double-strand break repair in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*. 147:1017-24.
- Holway, A.H., S.H. Kim, A. La Volpe, and W.M. Michael. 2006. Checkpoint silencing during the DNA damage response in *Caenorhabditis elegans* embryos. *J Cell Biol*. 172:999-1008.

- Hu, Y., S. Raynard, M.G. Sehorn, X. Lu, W. Bussen, L. Zheng, J.M. Stark, E.L. Barnes, P. Chi, P. Janscak, M. Jasin, H. Vogel, P. Sung, and G. Luo. 2007. RECQL5/Recql5 helicase regulates homologous recombination and suppresses tumor formation via disruption of Rad51 presynaptic filaments. *Genes Dev.* 21:3073-84.
- Huang, H., A. Kahana, D.E. Gottschling, L. Prakash, and S.W. Liebman. 1997. The ubiquitin-conjugating enzyme Rad6 (Ubc2) is required for silencing in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol.* 17:6693-9.
- Huang, J., M.S. Huen, H. Kim, C.C. Leung, J.N. Glover, X. Yu, and J. Chen. 2009. RAD18 transmits DNA damage signalling to elicit homologous recombination repair. *Nat Cell Biol.* 11:592-603.
- Huang, T.T., S.M. Nijman, K.D. Mirchandani, P.J. Galardy, M.A. Cohn, W. Haas, S.P. Gygi, H.L. Ploegh, R. Bernards, and A.D. D'Andrea. 2006. Regulation of monoubiquitinated PCNA by DUB autocleavage. *Nat Cell Biol.* 8:339-47.
- Huttner, D., and H.D. Ulrich. 2008. Cooperation of replication protein A with the ubiquitin ligase Rad18 in DNA damage bypass. *Cell Cycle.* 7:3629-33.
- Iftode, C., Y. Daniely, and J.A. Borowiec. 1999. Replication protein A (RPA): the eukaryotic SSB. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* 34:141-80.
- Inagaki, A., W.A. van Cappellen, R. van der Laan, A.B. Houtsmuller, J.H. Hoeijmakers, J.A. Grootegoed, and W.M. Baarends. 2009. Dynamic localization of human RAD18 during the cell cycle and a functional connection with DNA double-strand break repair. *DNA Repair (Amst).* 8:190-201.
- Iyer, L.M., M.M. Babu, and L. Aravind. 2006. The HIRAN domain and recruitment of chromatin remodeling and repair activities to damaged DNA. *Cell Cycle.* 5:775-82.
- Jansen, J.G., M.I. Fousteri, and N. de Wind. 2007. Send in the clamps: control of DNA translesion synthesis in eukaryotes. *Mol Cell.* 28:522-9.
- Jansen, J.G., P. Langerak, A. Tsaalbi-Shtylik, P. van den Berk, H. Jacobs, and N. de Wind. 2006. Strand-biased defect in C/G transversions in hypermutating immunoglobulin genes in Rev1-deficient mice. *J Exp Med.* 203:319-23.
- Jansen, J.G., A. Tsaalbi-Shtylik, G. Hendriks, H. Gali, A. Hendel, F. Johansson, K. Erixon, Z. Livneh, L.H. Mullenders, L. Haracska, and N. de Wind. 2009a. Separate domains of Rev1 mediate two modes of DNA damage bypass in mammalian cells. *Mol Cell Biol.* 29:3113-23.
- Jansen, J.G., A. Tsaalbi-Shtylik, G. Hendriks, J. Verspuy, H. Gali, L. Haracska, and N. de Wind. 2009b. Mammalian polymerase zeta is essential for post-replication repair of UV-induced DNA lesions. *DNA Repair (Amst).* 8:1444-51.
- Jansen, J.G., A. Tsaalbi-Shtylik, P. Langerak, F. Calleja, C.M. Meijers, H. Jacobs, and N. de Wind. 2005. The BRCT domain of mammalian Rev1 is involved in regulating DNA translesion synthesis. *Nucleic Acids Res.* 33:356-65.
- Jin, Y.H., R. Obert, P.M. Burgers, T.A. Kunkel, M.A. Resnick, and D.A. Gordenin. 2001. The 3'-->5' exonuclease of DNA polymerase delta can substitute for the 5' flap endonuclease Rad27/Fen1 in processing Okazaki fragments and preventing genome instability. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98:5122-7.
- Johansson, E., P. Garg, and P.M. Burgers. 2004. The Pol32 subunit of DNA polymerase delta contains separable domains for processive replication and proliferating cell nuclear antigen (PCNA) binding. *J Biol Chem.* 279:1907-15.
- Johnson, R.E., S.T. Henderson, T.D. Petes, S. Prakash, M. Bankmann, and L. Prakash. 1992. *Saccharomyces cerevisiae* RAD5-encoded DNA repair protein contains DNA helicase and zinc-binding sequence motifs and affects the stability of simple repetitive sequences in the genome. *Mol Cell Biol.* 12:3807-18.
- Johnson, R.E., S. Prakash, and L. Prakash. 1999. Efficient bypass of a thymine-thymine dimer by yeast DNA polymerase, Poleta. *Science.* 283:1001-4.

- Johnson, R.E., M.T. Washington, L. Haracska, S. Prakash, and L. Prakash. 2000a. Eukaryotic polymerases iota and zeta act sequentially to bypass DNA lesions. *Nature*. 406:1015-9.
- Johnson, R.E., M.T. Washington, S. Prakash, and L. Prakash. 2000b. Fidelity of human DNA polymerase eta. *J Biol Chem*. 275:7447-50.
- Johnson, R. E., Prakash, S. and Prakash, L. 2000c. The human DinB1 gene encodes the DNA polymerase Polq. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 97:3838-3843.
- Jones, J.S., S. Weber, and L. Prakash. 1988. The *Saccharomyces cerevisiae* RAD18 gene encodes a protein that contains potential zinc finger domains for nucleic acid binding and a putative nucleotide binding sequence. *Nucleic Acids Res*. 16:7119-31.
- Kai, M., and T.S. Wang. 2003a. Checkpoint activation regulates mutagenic translesion synthesis. *Genes Dev*. 17:64-76.
- Kai, M., and T.S. Wang. 2003b. Checkpoint responses to replication stalling: inducing tolerance and preventing mutagenesis. *Mutat Res*. 532:59-73.
- Kamiya, H., A. Yamaguchi, T. Suzuki, and H. Harashima. Roles of specialized DNA polymerases in mutagenesis by 8-hydroxyguanine in human cells. *Mutat Res*. 686:90-5.
- Kanao, R., F. Hanaoka, and C. Masutani. 2009. A novel interaction between human DNA polymerase eta and MutLalpha. *Biochem Biophys Res Commun*.
- Kannouche, P., B.C. Broughton, M. Volker, F. Hanaoka, L.H. Mullenders, and A.R. Lehmann. 2001. Domain structure, localization, and function of DNA polymerase eta, defective in xeroderma pigmentosum variant cells. *Genes Dev*. 15:158-72.
- Kannouche, P., A.R. Fernandez de Henestrosa, B. Coull, A.E. Vidal, C. Gray, D. Zicha, R. Woodgate, and A.R. Lehmann. 2002. Localization of DNA polymerases eta and iota to the replication machinery is tightly co-ordinated in human cells. *Embo J*. 21:6246-56.
- Kannouche, P.L., and A.R. Lehmann. 2004. Ubiquitination of PCNA and the polymerase switch in human cells. *Cell Cycle*. 3:1011-3.
- Kannouche, P.L., J. Wing, and A.R. Lehmann. 2004. Interaction of human DNA polymerase eta with monoubiquitinated PCNA: a possible mechanism for the polymerase switch in response to DNA damage. *Mol Cell*. 14:491-500.
- Karras, G.I., and S. Jentsch. The RAD6 DNA damage tolerance pathway operates uncoupled from the replication fork and is functional beyond S phase. *Cell*. 141:255-67.
- Kasai, H. 1997. Analysis of a form of oxidative DNA damage, 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine, as a marker of cellular oxidative stress during carcinogenesis. *Mutat Res*. 387:147-63.
- Katou, Y., Y. Kanoh, M. Bando, H. Noguchi, H. Tanaka, T. Ashikari, K. Sugimoto, and K. Shirahige. 2003. S-phase checkpoint proteins Tof1 and Mrc1 form a stable replication-pausing complex. *Nature*. 424:1078-83.
- Kaur, M., M. Pop, D. Shi, C. Brignone, and S.R. Grossman. 2007. hHR23B is required for genotoxic-specific activation of p53 and apoptosis. *Oncogene*. 26:1231-7.
- Kawamoto, T., K. Araki, E. Sonoda, Y.M. Yamashita, K. Harada, K. Kikuchi, C. Masutani, F. Hanaoka, K. Nozaki, N. Hashimoto, and S. Takeda. 2005. Dual roles for DNA polymerase eta in homologous DNA recombination and translesion DNA synthesis. *Mol Cell*. 20:793-9.
- Kim, H., J. Chen, and X. Yu. 2007. Ubiquitin-binding protein RAP80 mediates BRCA1-dependent DNA damage response. *Science*. 316:1202-5.
- Kim, S.H., and W.M. Michael. 2008. Regulated proteolysis of DNA polymerase eta during the DNA-damage response in *C. elegans*. *Mol Cell*. 32:757-66.
- Kim, Y., N.G. Starostina, and E.T. Kipreos. 2008. The CRL4Cdt2 ubiquitin ligase targets the degradation of p21Cip1 to control replication licensing. *Genes Dev*. 22:2507-19.
- Kitao, S., N.M. Lindor, M. Shiratori, Y. Furuichi, and A. Shimamoto. 1999. Rothmund-thomson syndrome responsible gene, RECQL4: genomic structure and products. *Genomics*. 61:268-76.

- Koken, M.H., P. Reynolds, I. Jaspers-Dekker, L. Prakash, S. Prakash, D. Bootsma, and J.H. Hoeijmakers. 1991. Structural and functional conservation of two human homologs of the yeast DNA repair gene RAD6. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 88:8865-9.
- Kosarek, J.N., R.V. Woodruff, A. Rivera-Begeman, C. Guo, S. D'Souza, E.V. Koonin, G.C. Walker, and E.C. Friedberg. 2008. Comparative analysis of in vivo interactions between Rev1 protein and other Y-family DNA polymerases in animals and yeasts. *DNA Repair (Amst)*. 7:439-51.
- Krasilnikov, A.S., I.G. Panyutin, G.M. Samadashwily, R. Cox, Y.S. Lazurkin, and S.M. Mirkin. 1997. Mechanisms of triplex-caused polymerization arrest. *Nucleic Acids Res*. 25:1339-46.
- Kremer, E.J., S. Yu, M. Pritchard, R. Nagaraja, D. Heitz, M. Lynch, E. Baker, V.J. Hyland, R.D. Little, M. Wada, and et al. 1991. Isolation of a human DNA sequence which spans the fragile X. *Am J Hum Genet*. 49:656-61.
- Kumagai, A., and W.G. Dunphy. 2000. Claspin, a novel protein required for the activation of Chk1 during a DNA replication checkpoint response in *Xenopus* egg extracts. *Mol Cell*. 6:839-49.
- Kumagai, A., J. Lee, H.Y. Yoo, and W.G. Dunphy. 2006. TopBP1 activates the ATR-ATRIP complex. *Cell*. 124:943-55.
- Larimer, F.W., J.R. Perry, and A.A. Hardigree. 1989. The REV1 gene of *Saccharomyces cerevisiae*: isolation, sequence, and functional analysis. *J Bacteriol*. 171:230-7.
- Lawrence, C. 1994. The RAD6 DNA repair pathway in *Saccharomyces cerevisiae*: what does it do, and how does it do it? *Bioessays*. 16:253-8.
- Lawrence, C.W. 2002. Cellular roles of DNA polymerase zeta and Rev1 protein. *DNA Repair (Amst)*. 1:425-35.
- Lawrence, C.W. 2004. Cellular functions of DNA polymerase zeta and Rev1 protein. *Adv Protein Chem*. 69:167-203.
- Lawrence, C.W., and R. Christensen. 1976. UV mutagenesis in radiation-sensitive strains of yeast. *Genetics*. 82:207-32.
- Lawrence, C.W., and R.B. Christensen. 1982. The mechanism of untargeted mutagenesis in UV-irradiated yeast. *Mol Gen Genet*. 186:1-9.
- Lawrence, C.W., and D.C. Hinkle. 1996. DNA polymerase zeta and the control of DNA damage induced mutagenesis in eukaryotes. *Cancer Surv*. 28:21-31.
- Lawrence, C.W., and V.M. Maher. 2001. Mutagenesis in eukaryotes dependent on DNA polymerase zeta and Rev1p. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 356:41-6.
- Leach, C.A., and W.M. Michael. 2005. Ubiquitin/SUMO modification of PCNA promotes replication fork progression in *Xenopus laevis* egg extracts. *J Cell Biol*. 171:947-54.
- Leach, F.S., N.C. Nicolaides, N. Papadopoulos, B. Liu, J. Jen, R. Parsons, P. Peltomaki, P. Sistonen, L.A. Aaltonen, M. Nystrom-Lahti, and et al. 1993. Mutations of a mutS homolog in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Cell*. 75:1215-25.
- Leahy, J.J., B.T. Golding, R.J. Griffin, I.R. Hardcastle, C. Richardson, L. Rigoreau, and G.C. Smith. 2004. Identification of a highly potent and selective DNA-dependent protein kinase (DNA-PK) inhibitor (NU7441) by screening of chromenone libraries. *Bioorg Med Chem Lett*. 14:6083-7.
- Lee, D.H., and G.P. Pfeifer. 2008. Translesion synthesis of 7,8-dihydro-8-oxo-2'-deoxyguanosine by DNA polymerase eta in vivo. *Mutat Res*. 641:19-26.
- Lee, H., S.X. Zeng, and H. Lu. 2006. UV Induces p21 rapid turnover independently of ubiquitin and Skp2. *J Biol Chem*. 281:26876-83.
- Lee, J., A. Kumagai, and W.G. Dunphy. 2003. Claspin, a Chk1-regulatory protein, monitors DNA replication on chromatin independently of RPA, ATR, and Rad17. *Mol Cell*. 11:329-40.
- Lee, J.H., and T.T. Paull. 2004. Direct activation of the ATM protein kinase by the Mre11/Rad50/Nbs1 complex. *Science*. 304:93-6.

- Lee, J.S., K.M. Collins, A.L. Brown, C.H. Lee, and J.H. Chung. 2000. hCds1-mediated phosphorylation of BRCA1 regulates the DNA damage response. *Nature*. 404:201-4.
- Lee, K.Y., and K. Myung. 2008. PCNA modifications for regulation of post-replication repair pathways. *Mol Cells*. 26:5-11.
- Lee, K.Y., K. Yang, M.A. Cohn, N. Sikdar, A.D. D'Andrea, and K. Myung. Human ELG1 regulates the level of ubiquitinated proliferating cell nuclear antigen (PCNA) through Its interactions with PCNA and USP1. *J Biol Chem*. 285:10362-9.
- Lee, S.H., and C.H. Kim. 2002. DNA-dependent protein kinase complex: a multifunctional protein in DNA repair and damage checkpoint. *Mol Cells*. 13:159-66.
- Lehmann, A.R. 2006. Translesion synthesis in mammalian cells. *Exp Cell Res*. 312:2673-6.
- Lehmann, A.R., and R.P. Fuchs. 2006. Gaps and forks in DNA replication: Rediscovering old models. *DNA Repair (Amst)*. 5:1495-8.
- Lehmann, A.R., S. Kirk-Bell, C.F. Arlett, S.A. Harcourt, E.A. de Weerd-Kastelein, W. Keijzer, and P. Hall-Smith. 1977. Repair of ultraviolet light damage in a variety of human fibroblast cell strains. *Cancer Res*. 37:904-10.
- Lehmann, A.R., S. Kirk-Bell, C.F. Arlett, M.C. Paterson, P.H. Lohman, E.A. de Weerd-Kastelein, and D. Bootsma. 1975. Xeroderma pigmentosum cells with normal levels of excision repair have a defect in DNA synthesis after UV-irradiation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 72:219-23.
- Lehmann, A.R., A. Niimi, T. Ogi, S. Brown, S. Sabbioneda, J.F. Wing, P.L. Kannouche, and C.M. Green. 2007. Translesion synthesis: Y-family polymerases and the polymerase switch. *DNA Repair (Amst)*. 6:891-9.
- Leibeling, D., P. Laspe, and S. Emmert. 2006. Nucleotide excision repair and cancer. *J Mol Histol*. 37:225-38.
- Lemee, F., C. Bavoux, M.J. Pillaire, A. Bieth, C.R. Machado, S.D. Pena, R. Guimbaud, J. Selves, J.S. Hoffmann, and C. Cazaux. 2007. Characterization of promoter regulatory elements involved in downexpression of the DNA polymerase kappa in colorectal cancer. *Oncogene*. 26:3387-94.
- Lemontt, J.F. 1971. Mutants of Yeast Defective in Mutation Induced by Ultraviolet Light. *Genetics*. 68:21-33.
- Lenne-Samuel, N., J. Wagner, H. Etienne, and R.P. Fuchs. 2002. The processivity factor beta controls DNA polymerase IV traffic during spontaneous mutagenesis and translesion synthesis in vivo. *EMBO Rep*. 3:45-9.
- Levine, R.L., H. Miller, A. Grollman, E. Ohashi, H. Ohmori, C. Masutani, F. Hanaoka, and M. Moriya. 2001. Translesion DNA synthesis catalyzed by human pol eta and pol kappa across 1,N6-ethenodeoxyadenosine. *J Biol Chem*. 276:18717-21.
- Li, H., B. Xie, A. Rahmeh, Y. Zhou, and M.Y. Lee. 2006. Direct interaction of p21 with p50, the small subunit of human DNA polymerase delta. *Cell Cycle*. 5:428-36.
- Li, Z., W. Xiao, J.J. McCormick, and V.M. Maher. 2002. Identification of a protein essential for a major pathway used by human cells to avoid UV- induced DNA damage. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 99:4459-64.
- Liefshitz, B., R. Steinlauf, A. Friedl, F. Eckardt-Schupp, and M. Kupiec. 1998. Genetic interactions between mutants of the 'error-prone' repair group of *Saccharomyces cerevisiae* and their effect on recombination and mutagenesis. *Mutat Res*. 407:135-45.
- Limoli, C.L., E. Giedzinski, and J.E. Cleaver. 2005. Alternative recombination pathways in UV-irradiated XP variant cells. *Oncogene*. 24:3708-14.
- Lin, W., H. Xin, Y. Zhang, X. Wu, F. Yuan, and Z. Wang. 1999. The human REV1 gene codes for a DNA template-dependent dCMP transferase. *Nucleic Acids Res*. 27:4468-75.
- Lindahl, T. 1993. Instability and decay of the primary structure of DNA. *Nature*. 362:709-15.
- Lindahl, T., and D.E. Barnes. 2000. Repair of endogenous DNA damage. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. 65:127-33.

- Lindahl, T., B. Rydberg, T. Hjelmgren, M. Olsson, and A. Jacobsson. 1982. Cellular defense mechanisms against alkylation of DNA. *Basic Life Sci.* 20:89-102.
- Lindahl, T., B. Sedgwick, M. Sekiguchi, and Y. Nakabeppu. 1988. Regulation and expression of the adaptive response to alkylating agents. *Annu Rev Biochem.* 57:133-57.
- Ling, H., F. Boudsocq, B.S. Plosky, R. Woodgate, and W. Yang. 2003. Replication of a cis-syn thymine dimer at atomic resolution. *Nature.* 424:1083-7.
- Ling, H., F. Boudsocq, R. Woodgate, and W. Yang. 2001. Crystal structure of a Y-family DNA polymerase in action: a mechanism for error-prone and lesion-bypass replication. *Cell.* 107:91-102.
- Liu, L.F., S.D. Desai, T.K. Li, Y. Mao, M. Sun, and S.P. Sim. 2000. Mechanism of action of camptothecin. *Ann N Y Acad Sci.* 922:1-10.
- Livneh, Z. 2006. Keeping mammalian mutation load in check: regulation of the activity of error-prone DNA polymerases by p53 and p21. *Cell Cycle.* 5:1918-22.
- Livneh, Z., O. Ziv, and S. Shachar. Multiple two-polymerase mechanisms in mammalian translesion DNA synthesis. *Cell Cycle.* 9:729-35.
- Lone, S., S.A. Townson, S.N. Uljon, R.E. Johnson, A. Brahma, D.T. Nair, S. Prakash, L. Prakash, and A.K. Aggarwal. 2007. Human DNA polymerase kappa encircles DNA: implications for mismatch extension and lesion bypass. *Mol Cell.* 25:601-14.
- Longo, N.S., and P.E. Lipsky. 2006. Why do B cells mutate their immunoglobulin receptors? *Trends Immunol.* 27:374-80.
- Lopes, M., C. Cotta-Ramusino, A. Pelliccioli, G. Liberi, P. Plevani, M. Muzi-Falconi, C.S. Newlon, and M. Foiani. 2001. The DNA replication checkpoint response stabilizes stalled replication forks. *Nature.* 412:557-61.
- Lopes, M., M. Foiani, and J.M. Sogo. 2006. Multiple mechanisms control chromosome integrity after replication fork uncoupling and restart at irreparable UV lesions. *Mol Cell.* 21:15-27.
- Lou, H., M. Komata, Y. Katou, Z. Guan, C.C. Reis, M. Budd, K. Shirahige, and J.L. Campbell. 2008. Mrc1 and DNA polymerase epsilon function together in linking DNA replication and the S phase checkpoint. *Mol Cell.* 32:106-17.
- Lu, X., C.K. Tan, J.Q. Zhou, M. You, L.M. Carastro, K.M. Downey, and A.G. So. 2002. Direct interaction of proliferating cell nuclear antigen with the small subunit of DNA polymerase delta. *J Biol Chem.* 277:24340-5.
- Ma, Y., and M.R. Lieber. 2002. Binding of inositol hexakisphosphate (IP6) to Ku but not to DNA-PKcs. *J Biol Chem.* 277:10756-9.
- Maga, G., G. Villani, E. Crespan, U. Wimmer, E. Ferrari, B. Bertocci, and U. Hubscher. 2007. 8-oxo-guanine bypass by human DNA polymerases in the presence of auxiliary proteins. *Nature.* 447:606-8.
- Mailand, N., J. Falck, C. Lukas, R.G. Syljuasen, M. Welcker, J. Bartek, and J. Lukas. 2000. Rapid destruction of human Cdc25A in response to DNA damage. *Science.* 288:1425-9.
- Majka, J., S.K. Binz, M.S. Wold, and P.M. Burgers. 2006. Replication protein A directs loading of the DNA damage checkpoint clamp to 5'-DNA junctions. *J Biol Chem.* 281:27855-61.
- Majka, J., and P.M. Burgers. 2004. The PCNA-RFC families of DNA clamps and clamp loaders. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol.* 78:227-60.
- Martomo, S.A., W.W. Yang, A. Vaisman, A. Maas, M. Yokoi, J.H. Hoeijmakers, F. Hanaoka, R. Woodgate, and P.J. Gearhart. 2006. Normal hypermutation in antibody genes from congenic mice defective for DNA polymerase iota. *DNA Repair (Amst).* 5:392-8.
- Martomo, S.A., W.W. Yang, R.P. Wersto, T. Ohkumo, Y. Kondo, M. Yokoi, C. Masutani, F. Hanaoka, and P.J. Gearhart. 2005. Different mutation signatures in DNA polymerase eta- and MSH6-deficient mice suggest separate roles in antibody diversification. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 102:8656-61.

- Masuda, K., R. Ouchida, Y. Li, X. Gao, H. Mori, and J.Y. Wang. 2009. A critical role for REV1 in regulating the induction of C:G transitions and A:T mutations during Ig gene hypermutation. *J Immunol.* 183:1846-50.
- Masuda, Y., M. Ohmae, K. Masuda, and K. Kamiya. 2003. Structure and enzymatic properties of a stable complex of the human REV1 and REV7 proteins. *J Biol Chem.* 278:12356-60.
- Masuda, Y., J. Piao, and K. Kamiya. DNA replication-coupled PCNA mono-ubiquitination and polymerase switching in a human in vitro system. *J Mol Biol.* 396:487-500.
- Masutani, C., M. Araki, A. Yamada, R. Kusumoto, T. Nogimori, T. Maekawa, S. Iwai, and F. Hanaoka. 1999a. Xeroderma pigmentosum variant (XP-V) correcting protein from HeLa cells has a thymine dimer bypass DNA polymerase activity. *Embo J.* 18:3491-501.
- Masutani, C., R. Kusumoto, S. Iwai, and F. Hanaoka. 2000. Mechanisms of accurate translesion synthesis by human DNA polymerase eta. *Embo J.* 19:3100-9.
- Masutani, C., R. Kusumoto, A. Yamada, N. Dohmae, M. Yokoi, M. Yuasa, M. Araki, S. Iwai, K. Takio, and F. Hanaoka. 1999b. The XPV (xeroderma pigmentosum variant) gene encodes human DNA polymerase eta. *Nature.* 399:700-4.
- Masuyama, S., S. Tateishi, K. Yomogida, Y. Nishimune, K. Suzuki, Y. Sakuraba, H. Inoue, M. Ogawa, and M. Yamaizumi. 2005. Regulated expression and dynamic changes in subnuclear localization of mammalian Rad18 under normal and genotoxic conditions. *Genes Cells.* 10:753-62.
- Matsuoka, S., B.A. Ballif, A. Smogorzewska, E.R. McDonald, 3rd, K.E. Hurov, J. Luo, C.E. Bakalarski, Z. Zhao, N. Solimini, Y. Lerenthal, Y. Shiloh, S.P. Gygi, and S.J. Elledge. 2007. ATM and ATR substrate analysis reveals extensive protein networks responsive to DNA damage. *Science.* 316:1160-6.
- Matsuoka, S., M. Huang, and S.J. Elledge. 1998. Linkage of ATM to cell cycle regulation by the Chk2 protein kinase. *Science.* 282:1893-7.
- Matsuoka, S., G. Rotman, A. Ogawa, Y. Shiloh, K. Tamai, and S.J. Elledge. 2000. Ataxia telangiectasia-mutated phosphorylates Chk2 in vivo and in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97:10389-94.
- McCulloch, S.D., R.J. Kokoska, O. Chilkova, C.M. Welch, E. Johansson, P.M. Burgers, and T.A. Kunkel. 2004a. Enzymatic switching for efficient and accurate translesion DNA replication. *Nucleic Acids Res.* 32:4665-75.
- McCulloch, S.D., R.J. Kokoska, and T.A. Kunkel. 2004b. Efficiency, fidelity and enzymatic switching during translesion DNA synthesis. *Cell Cycle.* 3:580-3.
- McCulloch, S.D., R.J. Kokoska, C. Masutani, S. Iwai, F. Hanaoka, and T.A. Kunkel. 2004c. Preferential cis-syn thymine dimer bypass by DNA polymerase eta occurs with biased fidelity. *Nature.* 428:97-100.
- McCulloch, S.D., and T.A. Kunkel. 2008. The fidelity of DNA synthesis by eukaryotic replicative and translesion synthesis polymerases. *Cell Res.* 18:148-61.
- McDonald, E.R., 3rd, G.S. Wu, T. Waldman, and W.S. El-Deiry. 1996. Repair Defect in p21 WAF1/CIP1 -/- human cancer cells. *Cancer Res.* 56:2250-5.
- McDonald, J.P., E.G. Frank, B.S. Plosky, I.B. Rogozin, C. Masutani, F. Hanaoka, R. Woodgate, and P.J. Gearhart. 2003. 129-derived strains of mice are deficient in DNA polymerase iota and have normal immunoglobulin hypermutation. *J Exp Med.* 198:635-43.
- McHugh, P.J., and S. Sarkar. 2006. DNA interstrand cross-link repair in the cell cycle: a critical role for polymerase zeta in G1 phase. *Cell Cycle.* 5:1044-7.
- McHugh, P.J., W.R. Sones, and J.A. Hartley. 2000. Repair of intermediate structures produced at DNA interstrand cross-links in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol.* 20:3425-33.
- McIlwraith, M.J., A. Vaisman, Y. Liu, E. Fanning, R. Woodgate, and S.C. West. 2005. Human DNA polymerase eta promotes DNA synthesis from strand invasion intermediates of homologous recombination. *Mol Cell.* 20:783-92.

- McIlwraith, M.J., and S.C. West. 2008. DNA repair synthesis facilitates RAD52-mediated second-end capture during DSB repair. *Mol Cell*. 29:510-6.
- Meijer. 2003. Le cycle de division cellulaire et sa régulation. *Oncologie*. 5:311-326.
- Mirchandani, K.D., R.M. McCaffrey, and A.D. D'Andrea. 2008. The Fanconi anemia core complex is required for efficient point mutagenesis and Rev1 foci assembly. *DNA Repair (Amst)*. 7:902-11.
- Mirkin, E.V., and S.M. Mirkin. 2007. Replication fork stalling at natural impediments. *Microbiol Mol Biol Rev*. 71:13-35.
- Miyase, S., S. Tateishi, K. Watanabe, K. Tomita, K. Suzuki, H. Inoue, and M. Yamaizumi. 2005. Differential regulation of Rad18 through Rad6-dependent mono- and polyubiquitination. *J Biol Chem*. 280:515-24.
- Mogi, S., C.E. Butcher, and D.H. Oh. 2008. DNA polymerase eta reduces the gamma-H2AX response to psoralen interstrand crosslinks in human cells. *Exp Cell Res*. 314:887-95.
- Moldovan, G.L., B. Pfander, and S. Jentsch. 2007. PCNA, the maestro of the replication fork. *Cell*. 129:665-79.
- Montelone, B.A., S. Prakash, and L. Prakash. 1981. Recombination and mutagenesis in rad6 mutants of *Saccharomyces cerevisiae*: evidence for multiple functions of the RAD6 gene. *Mol Gen Genet*. 184:410-5.
- Moon, A.F., M. Garcia-Diaz, V.K. Batra, W.A. Beard, K. Bebenek, T.A. Kunkel, S.H. Wilson, and L.C. Pedersen. 2007. The X family portrait: structural insights into biological functions of X family polymerases. *DNA Repair (Amst)*. 6:1709-25.
- Morrison, A., R.B. Christensen, J. Alley, A.K. Beck, E.G. Bernstein, J.F. Lemontt, and C.W. Lawrence. 1989. REV3, a *Saccharomyces cerevisiae* gene whose function is required for induced mutagenesis, is predicted to encode a nonessential DNA polymerase. *J Bacteriol*. 171:5659-67.
- Mossi, R., Z.O. Jonsson, B.L. Allen, S.H. Hardin, and U. Hubscher. 1997. Replication factor C interacts with the C-terminal side of proliferating cell nuclear antigen. *J Biol Chem*. 272:1769-76.
- Motegi, A., H.J. Liaw, K.Y. Lee, H.P. Roest, A. Maas, X. Wu, H. Moinova, S.D. Markowitz, H. Ding, J.H. Hoeijmakers, and K. Myung. 2008. Polyubiquitination of proliferating cell nuclear antigen by HLTF and SHPRH prevents genomic instability from stalled replication forks. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 105:12411-6.
- Motegi, A., R. Sood, H. Moinova, S.D. Markowitz, P.P. Liu, and K. Myung. 2006. Human SHPRH suppresses genomic instability through proliferating cell nuclear antigen polyubiquitination. *J Cell Biol*. 175:703-8.
- Mukhopadhyay, S., D.R. Clark, N.B. Watson, W. Zacharias, and W.G. McGregor. 2004. REV1 accumulates in DNA damage-induced nuclear foci in human cells and is implicated in mutagenesis by benzo[a]pyrenediolepoxide. *Nucleic Acids Res*. 32:5820-6.
- Murakumo, Y., S. Mizutani, M. Yamaguchi, M. Ichihara, and M. Takahashi. 2006. Analyses of ultraviolet-induced focus formation of hREV1 protein. *Genes Cells*. 11:193-205.
- Murakumo, Y., Y. Ogura, H. Ishii, S. Numata, M. Ichihara, C.M. Croce, R. Fishel, and M. Takahashi. 2001. Interactions in the error-prone postreplication repair proteins hREV1, hREV3, and hREV7. *J Biol Chem*. 276:35644-51.
- Muramatsu, M., K. Kinoshita, S. Fagarasan, S. Yamada, Y. Shinkai, and T. Honjo. 2000. Class switch recombination and hypermutation require activation-induced cytidine deaminase (AID), a potential RNA editing enzyme. *Cell*. 102:553-63.
- Nair, D.T., R.E. Johnson, L. Prakash, S. Prakash, and A.K. Aggarwal. 2005a. Human DNA polymerase iota incorporates dCTP opposite template G via a G.C + Hoogsteen base pair. *Structure*. 13:1569-77.
- Nair, D.T., R.E. Johnson, L. Prakash, S. Prakash, and A.K. Aggarwal. 2005b. Rev1 employs a novel mechanism of DNA synthesis using a protein template. *Science*. 309:2219-22.

- Nair, D.T., R.E. Johnson, S. Prakash, L. Prakash, and A.K. Aggarwal. 2004. Replication by human DNA polymerase- ι occurs by Hoogsteen base-pairing. *Nature*. 430:377-80.
- Nakajima, S., L. Lan, S. Kanno, N. Usami, K. Kobayashi, M. Mori, T. Shiomi, and A. Yasui. 2006. Replication-dependent and -independent responses of RAD18 to DNA damage in human cells. *J Biol Chem*. 281:34687-95.
- Nedelcheva, M.N., A. Roguev, L.B. Dolapchiev, A. Shevchenko, H.B. Taskov, A. Shevchenko, A.F. Stewart, and S.S. Stoyanov. 2005. Uncoupling of unwinding from DNA synthesis implies regulation of MCM helicase by Top1/Mrc1/Csm3 checkpoint complex. *J Mol Biol*. 347:509-21.
- Nelson, J.R., C.W. Lawrence, and D.C. Hinkle. 1996a. Deoxycytidyl transferase activity of yeast REV1 protein. *Nature*. 382:729-31.
- Nelson, J.R., C.W. Lawrence, and D.C. Hinkle. 1996b. Thymine-thymine dimer bypass by yeast DNA polymerase zeta. *Science*. 272:1646-9.
- Niedzwiedz, W., G. Mosedale, M. Johnson, C.Y. Ong, P. Pace, and K.J. Patel. 2004. The Fanconi anaemia gene FANCC promotes homologous recombination and error-prone DNA repair. *Mol Cell*. 15:607-20.
- Niimi, A., S. Brown, S. Sabbioneda, P.L. Kannouche, A. Scott, A. Yasui, C.M. Green, and A.R. Lehmann. 2008. Regulation of proliferating cell nuclear antigen ubiquitination in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 105:16125-30.
- Nikiforov, A., M. Svetlova, L. Solovjeva, L. Sasina, J. Siino, I. Nazarov, M. Bradbury, and N. Tomilin. 2004. DNA damage-induced accumulation of Rad18 protein at stalled replication forks in mammalian cells involves upstream protein phosphorylation. *Biochem Biophys Res Commun*. 323:831-7.
- Nikolaishvili-Feinberg, N., G.S. Jenkins, K.R. Nevis, D.P. Staus, C.O. Scarlett, K. Unsal-Kacmaz, W.K. Kaufmann, and M. Cordeiro-Stone. 2008. Ubiquitylation of proliferating cell nuclear antigen and recruitment of human DNA polymerase ϵ . *Biochemistry*. 47:4141-50.
- Nishitani, H., Y. Shiomi, H. Iida, M. Michishita, T. Takami, and T. Tsurimoto. 2008. CDK inhibitor p21 is degraded by a proliferating cell nuclear antigen-coupled Cul4-DDB1-Cdt2 pathway during S phase and after UV irradiation. *J Biol Chem*. 283:29045-52.
- Notenboom, V., R.G. Hibbert, S.E. van Rossum-Fikkert, J.V. Olsen, M. Mann, and T.K. Sixma. 2007. Functional characterization of Rad18 domains for Rad6, ubiquitin, DNA binding and PCNA modification. *Nucleic Acids Res*. 35:5819-30.
- Nousiainen, M., H.H. Sillje, G. Sauer, E.A. Nigg, and R. Korner. 2006. Phosphoproteome analysis of the human mitotic spindle. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 103:5391-6.
- Nuss, J.E., S.M. Patrick, G.G. Oakley, G.M. Alter, J.G. Robison, K. Dixon, and J.J. Turchi. 2005. DNA damage induced hyperphosphorylation of replication protein A. 1. Identification of novel sites of phosphorylation in response to DNA damage. *Biochemistry*. 44:8428-37.
- Nyberg, K.A., R.J. Michelson, C.W. Putnam, and T.A. Weinert. 2002. Toward maintaining the genome: DNA damage and replication checkpoints. *Annu Rev Genet*. 36:617-56.
- O'Driscoll, M., V.L. Ruiz-Perez, C.G. Woods, P.A. Jeggo, and J.A. Goodship. 2003. A splicing mutation affecting expression of ataxia-telangiectasia and Rad3-related protein (ATR) results in Seckel syndrome. *Nat Genet*. 33:497-501.
- O'Handley, S.F., D.G. Sanford, R. Xu, C.C. Lester, B.E. Hingerty, S. Broyde, and T.R. Krugh. 1993. Structural characterization of an N-acetyl-2-aminofluorene (AAF) modified DNA oligomer by NMR, energy minimization, and molecular dynamics. *Biochemistry*. 32:2481-97.
- Ogi, T., P. Kannouche, and A.R. Lehmann. 2005. Localisation of human Y-family DNA polymerase kappa: relationship to PCNA foci. *J Cell Sci*. 118:129-36.
- Ogi, T., T. Kato, Jr., T. Kato, and H. Ohmori. 1999. Mutation enhancement by DINB1, a mammalian homologue of the Escherichia coli mutagenesis protein dinB. *Genes Cells*. 4:607-18.

- Ogi, T., and A.R. Lehmann. 2006. The Y-family DNA polymerase kappa (pol kappa) functions in mammalian nucleotide-excision repair. *Nat Cell Biol.* 8:640-2.
- Ogi, T., E. Ohashi, and H. Ohmori. 2001. [Mutagenesis by Escherichia coli DinB and its mammalian homolog Pol kappa]. *Tanpakushitsu Kakusan Koso.* 46:1155-61.
- Ogi, T., Y. Shinkai, K. Tanaka, and H. Ohmori. 2002. Polkappa protects mammalian cells against the lethal and mutagenic effects of benzo[a]pyrene. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99:15548-53.
- Ohashi, E., K. Bebenek, T. Matsuda, W.J. Feaver, V.L. Gerlach, E.C. Friedberg, H. Ohmori, and T.A. Kunkel. 2000. Fidelity and processivity of DNA synthesis by DNA polymerase kappa, the product of the human DINB1 gene. *J Biol Chem.* 275:39678-84.
- Ohashi, E., T. Hanafusa, K. Kamei, I. Song, J. Tomida, H. Hashimoto, C. Vaziri, and H. Ohmori. 2009. Identification of a novel REV1-interacting motif necessary for DNA polymerase kappa function. *Genes Cells.* 14:101-11.
- Ohashi, E., Y. Murakumo, N. Kanjo, J. Akagi, C. Masutani, F. Hanaoka, and H. Ohmori. 2004. Interaction of hREV1 with three human Y-family DNA polymerases. *Genes Cells.* 9:523-31.
- Ohkumo, T., Y. Kondo, M. Yokoi, T. Tsukamoto, A. Yamada, T. Sugimoto, R. Kanao, Y. Higashi, H. Kondoh, M. Tatematsu, C. Masutani, and F. Hanaoka. 2006. UV-B radiation induces epithelial tumors in mice lacking DNA polymerase eta and mesenchymal tumors in mice deficient for DNA polymerase iota. *Mol Cell Biol.* 26:7696-706.
- Ohmori, H., E.C. Friedberg, R.P. Fuchs, M.F. Goodman, F. Hanaoka, D. Hinkle, T.A. Kunkel, C.W. Lawrence, Z. Livneh, T. Nohmi, L. Prakash, S. Prakash, T. Todo, G.C. Walker, Z. Wang, and R. Woodgate. 2001. The Y-family of DNA polymerases. *Mol Cell.* 8:7-8.
- Ohta, S., Y. Shiomi, K. Sugimoto, C. Obuse, and T. Tsurimoto. 2002. A proteomics approach to identify proliferating cell nuclear antigen (PCNA)-binding proteins in human cell lysates. Identification of the human CHL12/RFCs2-5 complex as a novel PCNA-binding protein. *J Biol Chem.* 277:40362-7.
- Okada, T., E. Sonoda, Y.M. Yamashita, S. Koyoshi, S. Tateishi, M. Yamaizumi, M. Takata, O. Ogawa, and S. Takeda. 2002. Involvement of vertebrate polkappa in Rad18-independent postreplication repair of UV damage. *J Biol Chem.* 277:48690-5.
- Okada, T., E. Sonoda, M. Yoshimura, Y. Kawano, H. Saya, M. Kohzaki, and S. Takeda. 2005. Multiple roles of vertebrate REV genes in DNA repair and recombination. *Mol Cell Biol.* 25:6103-11.
- Oku, T., S. Ikeda, H. Sasaki, K. Fukuda, H. Morioka, E. Ohtsuka, H. Yoshikawa, and T. Tsurimoto. 1998. Functional sites of human PCNA which interact with p21 (Cip1/Waf1), DNA polymerase delta and replication factor C. *Genes Cells.* 3:357-69.
- Okuda, T., X. Lin, J. Trang, and S.B. Howell. 2005. Suppression of hREV1 expression reduces the rate at which human ovarian carcinoma cells acquire resistance to cisplatin. *Mol Pharmacol.* 67:1852-60.
- Olsen, J.V., B. Blagoev, F. Gnad, B. Macek, C. Kumar, P. Mortensen, and M. Mann. 2006. Global, in vivo, and site-specific phosphorylation dynamics in signaling networks. *Cell.* 127:635-48.
- Osborn, A.J., and S.J. Elledge. 2003. Mrc1 is a replication fork component whose phosphorylation in response to DNA replication stress activates Rad53. *Genes Dev.* 17:1755-67.
- Pages, V., S.R. Santa Maria, L. Prakash, and S. Prakash. 2009. Role of DNA damage-induced replication checkpoint in promoting lesion bypass by translesion synthesis in yeast. *Genes Dev.* 23:1438-49.
- Papouli, E., S. Chen, A.A. Davies, D. Huttner, L. Krejci, P. Sung, and H.D. Ulrich. 2005. Crosstalk between SUMO and ubiquitin on PCNA is mediated by recruitment of the helicase Srs2p. *Mol Cell.* 19:123-33.

- Park, E.J., D.W. Chan, J.H. Park, M.A. Oettinger, and J. Kwon. 2003. DNA-PK is activated by nucleosomes and phosphorylates H2AX within the nucleosomes in an acetylation-dependent manner. *Nucleic Acids Res.* 31:6819-27.
- Parker, J.L., A.B. Bielen, I. Dikic, and H.D. Ulrich. 2007. Contributions of ubiquitin- and PCNA-binding domains to the activity of Polymerase eta in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res.* 35:881-9.
- Paull, T.T., E.P. Rogakou, V. Yamazaki, C.U. Kirchgessner, M. Gellert, and W.M. Bonner. 2000. A critical role for histone H2AX in recruitment of repair factors to nuclear foci after DNA damage. *Curr Biol.* 10:886-95.
- Paulovich, A.G., R.U. Margulies, B.M. Garvik, and L.H. Hartwell. 1997. RAD9, RAD17, and RAD24 are required for S phase regulation in *Saccharomyces cerevisiae* in response to DNA damage. *Genetics.* 145:45-62.
- Paulsen, R.D., and K.A. Cimprich. 2007. The ATR pathway: fine-tuning the fork. *DNA Repair (Amst).* 6:953-66.
- Pavlov, Y.I., P.V. Shcherbakova, and T.A. Kunkel. 2001. In vivo consequences of putative active site mutations in yeast DNA polymerases alpha, epsilon, delta, and zeta. *Genetics.* 159:47-64.
- Pence, M.G., P. Blans, C.N. Zink, T. Hollis, J.C. Fishbein, and F.W. Perrino. 2009. Lesion bypass of N2-ethylguanine by human DNA polymerase iota. *J Biol Chem.* 284:1732-40.
- Perucca, P., O. Cazzalini, O. Mortusewicz, D. Necchi, M. Savio, T. Nardo, L.A. Stivala, H. Leonhardt, M.C. Cardoso, and E. Prosperi. 2006. Spatiotemporal dynamics of p21CDKN1A protein recruitment to DNA-damage sites and interaction with proliferating cell nuclear antigen. *J Cell Sci.* 119:1517-27.
- Petermann, E., T. Helleday, and K.W. Caldecott. 2008. Claspin promotes normal replication fork rates in human cells. *Mol Biol Cell.* 19:2373-8.
- Petrini, J.H. 2007. Cell signaling. A touching response to damage. *Science.* 316:1138-9.
- Petta, T.B., S. Nakajima, A. Zlatanou, E. Despras, S. Couve-Privat, A. Ishchenko, A. Sarasin, A. Yasui, and P. Kannouche. 2008. Human DNA polymerase iota protects cells against oxidative stress. *Embo J.* 27:2883-95.
- Pfander, B., G.L. Moldovan, M. Sacher, C. Hoegge, and S. Jentsch. 2005. SUMO-modified PCNA recruits Srs2 to prevent recombination during S phase. *Nature.* 436:428-33.
- Pichierri, P., F. Rosselli, and A. Franchitto. 2003. Werner's syndrome protein is phosphorylated in an ATR/ATM-dependent manner following replication arrest and DNA damage induced during the S phase of the cell cycle. *Oncogene.* 22:1491-500.
- Pillaire, M.J., R. Betous, C. Conti, J. Czaplicki, P. Pasero, A. Bensimon, C. Cazaux, and J.S. Hoffmann. 2007. Upregulation of error-prone DNA polymerases beta and kappa slows down fork progression without activating the replication checkpoint. *Cell Cycle.* 6:471-7.
- Plosky, B.S., A.E. Vidal, A.R. Fernandez de Henestrosa, M.P. McLenigan, J.P. McDonald, S. Mead, and R. Woodgate. 2006. Controlling the subcellular localization of DNA polymerases iota and eta via interactions with ubiquitin. *Embo J.* 25:2847-55.
- Plosky, B.S., and R. Woodgate. 2004. Switching from high-fidelity replicases to low-fidelity lesion-bypass polymerases. *Curr Opin Genet Dev.* 14:113-9.
- Podust, V.N., L.M. Podust, F. Goubin, B. Ducommun, and U. Hubscher. 1995. Mechanism of inhibition of proliferating cell nuclear antigen-dependent DNA synthesis by the cyclin-dependent kinase inhibitor p21. *Biochemistry.* 34:8869-75.
- Poltoratsky, V., J.K. Horton, R. Prasad, and S.H. Wilson. 2005. REV1 mediated mutagenesis in base excision repair deficient mouse fibroblast. *DNA Repair (Amst).* 4:1182-8.
- Postow, L., C. Ullsperger, R.W. Keller, C. Bustamante, A.V. Vologodskii, and N.R. Cozzarelli. 2001. Positive torsional strain causes the formation of a four-way junction at replication forks. *J Biol Chem.* 276:2790-6.

- Prakash, L. 1981. Characterization of postreplication repair in *Saccharomyces cerevisiae* and effects of rad6, rad18, rev3 and rad52 mutations. *Mol Gen Genet.* 184:471-8.
- Prakash, S., R.E. Johnson, and L. Prakash. 2005. Eukaryotic translesion synthesis DNA polymerases: specificity of structure and function. *Annu Rev Biochem.* 74:317-53.
- Prakash, S., and L. Prakash. 2002. Translesion DNA synthesis in eukaryotes: a one- or two-polymerase affair. *Genes Dev.* 16:1872-83.
- Prakash, S., P. Sung, and L. Prakash. 1993. DNA repair genes and proteins of *Saccharomyces cerevisiae*. *Annu Rev Genet.* 27:33-70.
- Prives, C., and V. Gottifredi. 2008. The p21 and PCNA partnership: a new twist for an old plot. *Cell Cycle.* 7:3840-6.
- Pursell, Z.F., I. Isoz, E.B. Lundstrom, E. Johansson, and T.A. Kunkel. 2007. Yeast DNA polymerase epsilon participates in leading-strand DNA replication. *Science.* 317:127-30.
- Rada, C., J.M. Di Noia, and M.S. Neuberger. 2004. Mismatch recognition and uracil excision provide complementary paths to both Ig switching and the A/T-focused phase of somatic mutation. *Mol Cell.* 16:163-71.
- Rada, C., G.T. Williams, H. Nilsen, D.E. Barnes, T. Lindahl, and M.S. Neuberger. 2002. Immunoglobulin isotype switching is inhibited and somatic hypermutation perturbed in UNG-deficient mice. *Curr Biol.* 12:1748-55.
- Rattray, A.J., B.K. Shafer, C.B. McGill, and J.N. Strathern. 2002. The roles of REV3 and RAD57 in double-strand-break-repair-induced mutagenesis of *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics.* 162:1063-77.
- Rey, L., J.M. Sidorova, N. Puget, F. Boudsocq, D.S. Biard, R.J. Monnat, Jr., C. Cazaux, and J.S. Hoffmann. 2009. Human DNA polymerase eta is required for common fragile site stability during unperturbed DNA replication. *Mol Cell Biol.* 29:3344-54.
- Reynaud, C.A., S. Aoufouchi, A. Faili, and J.C. Weill. 2003. What role for AID: mutator, or assembler of the immunoglobulin mutasome? *Nat Immunol.* 4:631-8.
- Roest, H.P., W.M. Baarends, J. de Wit, J.W. van Klaveren, E. Wassenaar, J.W. Hoogerbrugge, W.A. van Cappellen, J.H. Hoeijmakers, and J.A. Grootegoed. 2004. The ubiquitin-conjugating DNA repair enzyme HR6A is a maternal factor essential for early embryonic development in mice. *Mol Cell Biol.* 24:5485-95.
- Roest, H.P., J. van Klaveren, J. de Wit, C.G. van Gulp, M.H. Koken, M. Vermey, J.H. van Roijen, J.W. Hoogerbrugge, J.T. Vreeburg, W.M. Baarends, D. Bootsma, J.A. Grootegoed, and J.H. Hoeijmakers. 1996. Inactivation of the HR6B ubiquitin-conjugating DNA repair enzyme in mice causes male sterility associated with chromatin modification. *Cell.* 86:799-810.
- Ross, A.L., and J.E. Sale. 2006. The catalytic activity of REV1 is employed during immunoglobulin gene diversification in DT40. *Mol Immunol.* 43:1587-94.
- Ross, A.L., L.J. Simpson, and J.E. Sale. 2005. Vertebrate DNA damage tolerance requires the C-terminus but not BRCT or transferase domains of REV1. *Nucleic Acids Res.* 33:1280-9.
- Rothfuss, A., and M. Grompe. 2004. Repair kinetics of genomic interstrand DNA cross-links: evidence for DNA double-strand break-dependent activation of the Fanconi anemia/BRCA pathway. *Mol Cell Biol.* 24:123-34.
- Sabbioneda, S., I. Bortolomai, M. Giannattasio, P. Plevani, and M. Muzi-Falconi. 2007. Yeast Rev1 is cell cycle regulated, phosphorylated in response to DNA damage and its binding to chromosomes is dependent upon MEC1. *DNA Repair (Amst).* 6:121-7.
- Sabbioneda, S., A.M. Gourdin, C.M. Green, A. Zotter, G. Giglia-Mari, A. Houtsmuller, W. Vermeulen, and A.R. Lehmann. 2008. Effect of proliferating cell nuclear antigen ubiquitination and chromatin structure on the dynamic properties of the Y-family DNA polymerases. *Mol Biol Cell.* 19:5193-202.

- Sabbioneda, S., C.M. Green, M. Bienko, P. Kannouche, I. Dikic, and A.R. Lehmann. 2009. Ubiquitin-binding motif of human DNA polymerase eta is required for correct localization. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 106:E20; author reply E21.
- Sabbioneda, S., B.K. Minesinger, M. Giannattasio, P. Plevani, M. Muzi-Falconi, and S. Jinks-Robertson. 2005. The 9-1-1 checkpoint clamp physically interacts with polzeta and is partially required for spontaneous polzeta-dependent mutagenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*. 280:38657-65.
- Saberi, A., H. Hochegger, D. Szuts, L. Lan, A. Yasui, J.E. Sale, Y. Taniguchi, Y. Murakawa, W. Zeng, K. Yokomori, T. Helleday, H. Teraoka, H. Arakawa, J.M. Buerstedde, and S. Takeda. 2007. RAD18 and poly(ADP-ribose) polymerase independently suppress the access of nonhomologous end joining to double-strand breaks and facilitate homologous recombination-mediated repair. *Mol Cell Biol*. 27:2562-71.
- Samadashwily, G.M., G. Raca, and S.M. Mirkin. 1997. Trinucleotide repeats affect DNA replication in vivo. *Nat Genet*. 17:298-304.
- Sancar, A. 1994. Structure and function of DNA photolyase. *Biochemistry*. 33:2-9.
- Santocanale, C., and J.F. Diffley. 1998. A Mec1- and Rad53-dependent checkpoint controls late-firing origins of DNA replication. *Nature*. 395:615-8.
- Santocanale, C., K. Sharma, and J.F. Diffley. 1999. Activation of dormant origins of DNA replication in budding yeast. *Genes Dev*. 13:2360-4.
- Sarkar, S., A.A. Davies, H.D. Ulrich, and P.J. McHugh. 2006. DNA interstrand crosslink repair during G1 involves nucleotide excision repair and DNA polymerase zeta. *Embo J*. 25:1285-94.
- Sarkaria, J.N., E.C. Busby, R.S. Tibbetts, P. Roos, Y. Taya, L.M. Karnitz, and R.T. Abraham. 1999. Inhibition of ATM and ATR kinase activities by the radiosensitizing agent, caffeine. *Cancer Res*. 59:4375-82.
- Sarkaria, J.N., R.S. Tibbetts, E.C. Busby, A.P. Kennedy, D.E. Hill, and R.T. Abraham. 1998. Inhibition of phosphoinositide 3-kinase related kinases by the radiosensitizing agent wortmannin. *Cancer Res*. 58:4375-82.
- Schiestl, R.H., R.D. Gietz, P.J. Hastings, and U. Wintersberger. 1990. Interchromosomal and intrachromosomal recombination in rad 18 mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Gen Genet*. 222:25-32.
- Schultz, L.B., N.H. Chehab, A. Malikzay, and T.D. Halazonetis. 2000. p53 binding protein 1 (53BP1) is an early participant in the cellular response to DNA double-strand breaks. *J Cell Biol*. 151:1381-90.
- Scorah, J., M.Q. Dong, J.R. Yates, 3rd, M. Scott, D. Gillespie, and C.H. McGowan. 2008. A conserved proliferating cell nuclear antigen-interacting protein sequence in Chk1 is required for checkpoint function. *J Biol Chem*. 283:17250-9.
- Scorah, J., and C.H. McGowan. 2009. Claspin and Chk1 regulate replication fork stability by different mechanisms. *Cell Cycle*. 8:1036-43.
- Seeberg, E., L. Eide, and M. Bjoras. 1995. The base excision repair pathway. *Trends Biochem Sci*. 20:391-7.
- Sekimoto, T., T. Oda, F.M. Pozo, Y. Murakumo, C. Masutani, F. Hanaoka, and T. Yamashita. The molecular chaperone Hsp90 regulates accumulation of DNA polymerase eta at replication stalling sites in UV-irradiated cells. *Mol Cell*. 37:79-89.
- Senga, T., U. Sivaprasad, W. Zhu, J.H. Park, E.E. Arias, J.C. Walter, and A. Dutta. 2006. PCNA is a cofactor for Cdt1 degradation by CUL4/DDB1-mediated N-terminal ubiquitination. *J Biol Chem*. 281:6246-52.
- Shachar, S., O. Ziv, S. Avkin, S. Adar, J. Wittschieben, T. Reissner, S. Chaney, E.C. Friedberg, Z. Wang, T. Carell, N. Geacintov, and Z. Livneh. 2009. Two-polymerase mechanisms dictate error-free and error-prone translesion DNA synthesis in mammals. *Embo J*. 28:383-93.

- Sharma, S., and R.M. Brosh, Jr. 2007. Human RECQ1 is a DNA damage responsive protein required for genotoxic stress resistance and suppression of sister chromatid exchanges. *PLoS One*. 2:e1297.
- Sheikh, M.S., Y.Q. Chen, M.L. Smith, and A.J. Fornace, Jr. 1997. Role of p21Waf1/Cip1/Sdi1 in cell death and DNA repair as studied using a tetracycline-inducible system in p53-deficient cells. *Oncogene*. 14:1875-82.
- Shen, X., S. Jun, L.E. O'Neal, E. Sonoda, M. Bemark, J.E. Sale, and L. Li. 2006. REV3 and REV1 play major roles in recombination-independent repair of DNA interstrand cross-links mediated by monoubiquitinated proliferating cell nuclear antigen (PCNA). *J Biol Chem*. 281:13869-72.
- Sherman, L.A., and M.L. Gefter. 1976. Studies on the mechanism of enzymatic DNA elongation by *Escherichia coli* DNA polymerase II. *J Mol Biol*. 103:61-76.
- Sherr, C.J., and J.M. Roberts. 1999. CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev*. 13:1501-12.
- Shiloh, Y. 1997. Ataxia-telangiectasia and the Nijmegen breakage syndrome: related disorders but genes apart. *Annu Rev Genet*. 31:635-62.
- Shimizu, T., T. Azuma, M. Ishiguro, N. Kanjo, S. Yamada, and H. Ohmori. 2005. Normal immunoglobulin gene somatic hypermutation in Pol kappa-Pol iota double-deficient mice. *Immunol Lett*. 98:259-64.
- Shiomi, N., M. Mori, H. Tsuji, T. Imai, H. Inoue, S. Tateishi, M. Yamaizumi, and T. Shiomi. 2007. Human RAD18 is involved in S phase-specific single-strand break repair without PCNA monoubiquitination. *Nucleic Acids Res*. 35:e9.
- Shirahige, K., Y. Hori, K. Shiraishi, M. Yamashita, K. Takahashi, C. Obuse, T. Tsurimoto, and H. Yoshikawa. 1998. Regulation of DNA-replication origins during cell-cycle progression. *Nature*. 395:618-21.
- Siitonen, H.A., O. Kopra, H. Kaariainen, H. Haravuori, R.M. Winter, A.M. Saamanen, L. Peltonen, and M. Kestila. 2003. Molecular defect of RAPADILINO syndrome expands the phenotype spectrum of RECQL diseases. *Hum Mol Genet*. 12:2837-44.
- Silvian, L.F., E.A. Toth, P. Pham, M.F. Goodman, and T. Ellenberger. 2001. Crystal structure of a DinB family error-prone DNA polymerase from *Sulfolobus solfataricus*. *Nat Struct Biol*. 8:984-9.
- Simpson, L.J., A.L. Ross, D. Szuts, C.A. Alviani, V.H. Oestergaard, K.J. Patel, and J.E. Sale. 2006. RAD18-independent ubiquitination of proliferating-cell nuclear antigen in the avian cell line DT40. *EMBO Rep*. 7:927-32.
- Smith, M.L., J.M. Ford, M.C. Hollander, R.A. Bortnick, S.A. Amundson, Y.R. Seo, C.X. Deng, P.C. Hanawalt, and A.J. Fornace, Jr. 2000. p53-mediated DNA repair responses to UV radiation: studies of mouse cells lacking p53, p21, and/or gadd45 genes. *Mol Cell Biol*. 20:3705-14.
- Sobhian, B., G. Shao, D.R. Lilli, A.C. Culhane, L.A. Moreau, B. Xia, D.M. Livingston, and R.A. Greenberg. 2007. RAP80 targets BRCA1 to specific ubiquitin structures at DNA damage sites. *Science*. 316:1198-202.
- Sogo, J.M., M. Lopes, and M. Foiani. 2002. Fork reversal and ssDNA accumulation at stalled replication forks owing to checkpoint defects. *Science*. 297:599-602.
- Sonoda, E., T. Okada, G.Y. Zhao, S. Tateishi, K. Araki, M. Yamaizumi, T. Yagi, N.S. Verkaik, D.C. van Gent, M. Takata, and S. Takeda. 2003. Multiple roles of Rev3, the catalytic subunit of polzeta in maintaining genome stability in vertebrates. *Embo J*. 22:3188-97.
- Sorensen, C.S., L.T. Hansen, J. Dziegielewska, R.G. Syljuasen, C. Lundin, J. Bartek, and T. Helleday. 2005. The cell-cycle checkpoint kinase Chk1 is required for mammalian homologous recombination repair. *Nat Cell Biol*. 7:195-201.

- Soria, G., L. Belluscio, W.A. van Cappellen, R. Kanaar, J. Essers, and V. Gottifredi. 2009. DNA damage induced Pol eta recruitment takes place independently of the cell cycle phase. *Cell Cycle*. 8:3340-8.
- Soria, G., and V. Gottifredi. PCNA-coupled p21 degradation after DNA damage: The exception that confirms the rule? *DNA Repair (Amst)*. 9:358-64.
- Soria, G., O. Podhajcer, C. Prives, and V. Gottifredi. 2006. P21Cip1/WAF1 downregulation is required for efficient PCNA ubiquitination after UV irradiation. *Oncogene*. 25:2829-38.
- Soria, G., J. Speroni, O.L. Podhajcer, C. Prives, and V. Gottifredi. 2008. p21 differentially regulates DNA replication and DNA-repair-associated processes after UV irradiation. *J Cell Sci*. 121:3271-82.
- Soubeyrand, S., H. Torrance, W. Giffin, W. Gong, C. Schild-Poulter, and R.J. Hache. 2001. Activation and autoregulation of DNA-PK from structured single-stranded DNA and coding end hairpins. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 98:9605-10.
- Stary, A., P. Kannouche, A.R. Lehmann, and A. Sarasin. 2003. Role of DNA polymerase eta in the UV mutation spectrum in human cells. *J Biol Chem*. 278:18767-75.
- Stelter, P., and H.D. Ulrich. 2003. Control of spontaneous and damage-induced mutagenesis by SUMO and ubiquitin conjugation. *Nature*. 425:188-91.
- Stevens, C., L. Smith, and N.B. La Thangue. 2003. Chk2 activates E2F-1 in response to DNA damage. *Nat Cell Biol*. 5:401-9.
- Sun, Y., X. Jiang, S. Chen, N. Fernandes, and B.D. Price. 2005. A role for the Tip60 histone acetyltransferase in the acetylation and activation of ATM. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 102:13182-7.
- Sung, P., S. Prakash, and L. Prakash. 1990. Mutation of cysteine-88 in the *Saccharomyces cerevisiae* RAD6 protein abolishes its ubiquitin-conjugating activity and its various biological functions. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 87:2695-9.
- Surtees, J.A., J.L. Argueso, and E. Alani. 2004. Mismatch repair proteins: key regulators of genetic recombination. *Cytogenet Genome Res*. 107:146-59.
- Sutherland, G.R., E. Baker, and R.I. Richards. 1998. Fragile sites still breaking. *Trends Genet*. 14:501-6.
- Suzuki, N., E. Ohashi, A. Kolbanovskiy, N.E. Geacintov, A.P. Grollman, H. Ohmori, and S. Shibutani. 2002. Translesion synthesis by human DNA polymerase kappa on a DNA template containing a single stereoisomer of dG-(+)- or dG-(-)-anti-N(2)-BPDE (7,8-dihydroxy-anti-9,10-epoxy-7,8,9,10-tetrahydrobenzo[a]pyrene). *Biochemistry*. 41:6100-6.
- Svoboda, D.L., L.P. Briley, and J.M. Vos. 1998. Defective bypass replication of a leading strand cyclobutane thymine dimer in xeroderma pigmentosum variant cell extracts. *Cancer Res*. 58:2445-8.
- Szekely, A.M., Y.H. Chen, C. Zhang, J. Oshima, and S.M. Weissman. 2000. Werner protein recruits DNA polymerase delta to the nucleolus. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 97:11365-70.
- Szuts, D., L.J. Simpson, S. Kabani, M. Yamazoe, and J.E. Sale. 2006. Role for RAD18 in homologous recombination in DT40 cells. *Mol Cell Biol*. 26:8032-41.
- Szyjka, S.J., J.G. Aparicio, C.J. Viggiani, S. Knott, W. Xu, S. Tavare, and O.M. Aparicio. 2008. Rad53 regulates replication fork restart after DNA damage in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev*. 22:1906-20.
- Szyjka, S.J., C.J. Viggiani, and O.M. Aparicio. 2005. Mrc1 is required for normal progression of replication forks throughout chromatin in *S. cerevisiae*. *Mol Cell*. 19:691-7.
- Takata, M., M.S. Sasaki, E. Sonoda, C. Morrison, M. Hashimoto, H. Utsumi, Y. Yamaguchi-Iwai, A. Shinohara, and S. Takeda. 1998. Homologous recombination and non-homologous end-joining pathways of DNA double-strand break repair have overlapping roles in the maintenance of chromosomal integrity in vertebrate cells. *Embo J*. 17:5497-508.

- Takeuchi, R., M. Oshige, M. Uchida, G. Ishikawa, K. Takata, K. Shimanouchi, Y. Kanai, T. Ruike, H. Morioka, and K. Sakaguchi. 2004. Purification of *Drosophila* DNA polymerase zeta by REV1 protein-affinity chromatography. *Biochem J.* 382:535-43.
- Tateishi, S., H. Niwa, J. Miyazaki, S. Fujimoto, H. Inoue, and M. Yamaizumi. 2003. Enhanced genomic instability and defective postreplication repair in RAD18 knockout mouse embryonic stem cells. *Mol Cell Biol.* 23:474-81.
- Tateishi, S., Y. Sakuraba, S. Masuyama, H. Inoue, and M. Yamaizumi. 2000. Dysfunction of human Rad18 results in defective postreplication repair and hypersensitivity to multiple mutagens. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97:7927-32.
- Teoule, R., and J. Cadet. 1978. Radiation-induced degradation of the base component in DNA and related substances--final products. *Mol Biol Biochem Biophys.* 27:171-203.
- Terai, K., T. Abbas, A.A. Jazaeri, and A. Dutta. CRL4(Cdt2) E3 ubiquitin ligase monoubiquitinates PCNA to promote translesion DNA synthesis. *Mol Cell.* 37:143-9.
- Tercero, J.A., and J.F. Diffley. 2001. Regulation of DNA replication fork progression through damaged DNA by the Mec1/Rad53 checkpoint. *Nature.* 412:553-7.
- Tissier, A., P. Kannouche, M.P. Reck, A.R. Lehmann, R.P. Fuchs, and A. Cordonnier. 2004. Colocalization in replication foci and interaction of human Y-family members, DNA polymerase pol eta and REV1 protein. *DNA Repair (Amst).* 3:1503-14.
- Tissier, A., J.P. McDonald, E.G. Frank, and R. Woodgate. 2000. poliota, a remarkably error-prone human DNA polymerase. *Genes Dev.* 14:1642-50.
- Tornaletti, S., and P.C. Hanawalt. 1999. Effect of DNA lesions on transcription elongation. *Biochimie.* 81:139-46.
- Tourriere, H., G. Versini, V. Cordon-Preciado, C. Alabert, and P. Pasero. 2005. Mrc1 and Tof1 promote replication fork progression and recovery independently of Rad53. *Mol Cell.* 19:699-706.
- Trincao, J., R.E. Johnson, C.R. Escalante, S. Prakash, L. Prakash, and A.K. Aggarwal. 2001. Structure of the catalytic core of *S. cerevisiae* DNA polymerase eta: implications for translesion DNA synthesis. *Mol Cell.* 8:417-26.
- Tsuji, Y., K. Watanabe, K. Araki, M. Shinohara, Y. Yamagata, T. Tsurimoto, F. Hanaoka, K. Yamamura, M. Yamaizumi, and S. Tateishi. 2008. Recognition of forked and single-stranded DNA structures by human RAD18 complexed with RAD6B protein triggers its recruitment to stalled replication forks. *Genes Cells.* 13:343-54.
- Tsurimoto, T., A. Shinozaki, M. Yano, M. Seki, and T. Enomoto. 2005. Human Werner helicase interacting protein 1 (WRNIP1) functions as a novel modulator for DNA polymerase delta. *Genes Cells.* 10:13-22.
- Uljon, S.N., R.E. Johnson, T.A. Edwards, S. Prakash, L. Prakash, and A.K. Aggarwal. 2004. Crystal structure of the catalytic core of human DNA polymerase kappa. *Structure.* 12:1395-404.
- Ulrich, H.D. 2009. Regulating post-translational modifications of the eukaryotic replication clamp PCNA. *DNA Repair (Amst).* 8:461-9.
- Ulrich, H.D., and S. Jentsch. 2000. Two RING finger proteins mediate cooperation between ubiquitin-conjugating enzymes in DNA repair. *Embo J.* 19:3388-97.
- Unk, I., I. Hajdu, K. Fatyol, J. Hurwitz, J.H. Yoon, L. Prakash, S. Prakash, and L. Haracska. 2008. Human HLTF functions as a ubiquitin ligase for proliferating cell nuclear antigen polyubiquitination. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 105:3768-73.
- Unk, I., I. Hajdu, K. Fatyol, B. Szakal, A. Blastyak, V. Bermudez, J. Hurwitz, L. Prakash, S. Prakash, and L. Haracska. 2006. Human SHPRH is a ubiquitin ligase for Mms2-Ubc13-dependent polyubiquitylation of proliferating cell nuclear antigen. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103:18107-12.

- Unsal-Kacmaz, K., P.D. Chastain, P.P. Qu, P. Minoo, M. Cordeiro-Stone, A. Sancar, and W.K. Kaufmann. 2007. The human Tim/Tipin complex coordinates an Intra-S checkpoint response to UV that slows replication fork displacement. *Mol Cell Biol.* 27:3131-42.
- Usdin, K., and K.J. Woodford. 1995. CGG repeats associated with DNA instability and chromosome fragility form structures that block DNA synthesis in vitro. *Nucleic Acids Res.* 23:4202-9.
- Vaisman, A., C. Masutani, F. Hanaoka, and S.G. Chaney. 2000. Efficient translesion replication past oxaliplatin and cisplatin GpG adducts by human DNA polymerase eta. *Biochemistry.* 39:4575-80.
- van der Schans, G.P., J.F. Bleichrodt, and J. Blok. 1973. Contribution of various types of damage to inactivation of a biologically-active double-stranded circular DNA by gamma-radiation. *Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med.* 23:133-50.
- Van Maldergem, L., H.A. Siitonen, N. Jalkh, E. Chouery, M. De Roy, V. Delague, M. Muenke, E.W. Jabs, J. Cai, L.L. Wang, S.E. Plon, C. Fourneau, M. Kestila, Y. Gillerot, A. Megarbane, and A. Verloes. 2006. Revisiting the craniosynostosis-radial ray hypoplasia association: Baller-Gerold syndrome caused by mutations in the RECQL4 gene. *J Med Genet.* 43:148-52.
- Van Sloun, P.P., I. Varlet, E. Sonneveld, J.J. Boei, R.J. Romeijn, J.C. Eeken, and N. De Wind. 2002. Involvement of mouse Rev3 in tolerance of endogenous and exogenous DNA damage. *Mol Cell Biol.* 22:2159-69.
- Velasco-Miguel, S., J.A. Richardson, V.L. Gerlach, W.C. Lai, T. Gao, L.D. Russell, C.L. Hladik, C.L. White, and E.C. Friedberg. 2003. Constitutive and regulated expression of the mouse Dinb (Polkappa) gene encoding DNA polymerase kappa. *DNA Repair (Amst).* 2:91-106.
- Vidal, A.E., P. Kannouche, V.N. Podust, W. Yang, A.R. Lehmann, and R. Woodgate. 2004. Proliferating cell nuclear antigen-dependent coordination of the biological functions of human DNA polymerase iota. *J Biol Chem.* 279:48360-8.
- Vidal, A.E., and R. Woodgate. 2009. Insights into the cellular role of enigmatic DNA polymerase iota. *DNA Repair (Amst).* 8:420-3.
- Virsik-Kopp, P., M. Rave-Frank, H. Hofman-Huther, and H. Schmidberger. 2004. Role of DNA-dependent protein kinase in the process of radiation-induced aberration formation. *Int J Radiat Biol.* 80:125-33.
- Voineagu, I., V. Narayanan, K.S. Lobachev, and S.M. Mirkin. 2008. Replication stalling at unstable inverted repeats: interplay between DNA hairpins and fork stabilizing proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 105:9936-41.
- Waga, S., G.J. Hannon, D. Beach, and B. Stillman. 1994. The p21 inhibitor of cyclin-dependent kinases controls DNA replication by interaction with PCNA. *Nature.* 369:574-8.
- Wallach, D.F. 1972. Infrared and laser Raman spectroscopy in membrane analysis. *Chem Phys Lipids.* 8:347-54.
- Wang, B., S. Matsuoka, B.A. Ballif, D. Zhang, A. Smogorzewska, S.P. Gygi, and S.J. Elledge. 2007. Abraxas and RAP80 form a BRCA1 protein complex required for the DNA damage response. *Science.* 316:1194-8.
- Wang, H.C., W.C. Chou, S.Y. Shieh, and C.Y. Shen. 2006. Ataxia telangiectasia mutated and checkpoint kinase 2 regulate BRCA1 to promote the fidelity of DNA end-joining. *Cancer Res.* 66:1391-400.
- Wang, J., W. Ouyang, J. Li, L. Wei, Q. Ma, Z. Zhang, Q. Tong, J. He, and C. Huang. 2005. Loss of tumor suppressor p53 decreases PTEN expression and enhances signaling pathways leading to activation of activator protein 1 and nuclear factor kappaB induced by UV radiation. *Cancer Res.* 65:6601-11.
- Wang, Q., X. Wang, A. Hernandez, S. Kim, and B.M. Evers. 2001. Inhibition of the phosphatidylinositol 3-kinase pathway contributes to HT29 and Caco-2 intestinal cell differentiation. *Gastroenterology.* 120:1381-92.

- Wang, Y., M. Seimiya, K. Kawamura, L. Yu, T. Ogi, K. Takenaga, T. Shishikura, A. Nakagawara, S. Sakiyama, M. Tagawa, and O.W. J. 2004. Elevated expression of DNA polymerase kappa in human lung cancer is associated with p53 inactivation: Negative regulation of POLK promoter activity by p53. *Int J Oncol.* 25:161-5.
- Warbrick, E. 1998. PCNA binding through a conserved motif. *Bioessays.* 20:195-9.
- Ward, I.M., and J. Chen. 2001. Histone H2AX is phosphorylated in an ATR-dependent manner in response to replicational stress. *J Biol Chem.* 276:47759-62.
- Ward, J.F. 1981. Some biochemical consequences of the spatial distribution of ionizing radiation-produced free radicals. *Radiat Res.* 86:185-95.
- Washington, M.T., R.E. Johnson, S. Prakash, and L. Prakash. 2000. Accuracy of thymine-thymine dimer bypass by *Saccharomyces cerevisiae* DNA polymerase eta. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97:3094-9.
- Washington, M.T., I.G. Minko, R.E. Johnson, L. Haracska, T.M. Harris, R.S. Lloyd, S. Prakash, and L. Prakash. 2004. Efficient and error-free replication past a minor-groove N2-guanine adduct by the sequential action of yeast Rev1 and DNA polymerase zeta. *Mol Cell Biol.* 24:6900-6.
- Watanabe, K., K. Iwabuchi, J. Sun, Y. Tsuji, T. Tani, K. Tokunaga, T. Date, M. Hashimoto, M. Yamaizumi, and S. Tateishi. 2009. RAD18 promotes DNA double-strand break repair during G1 phase through chromatin retention of 53BP1. *Nucleic Acids Res.* 37:2176-93.
- Watanabe, K., S. Tateishi, M. Kawasuji, T. Tsurimoto, H. Inoue, and M. Yamaizumi. 2004. Rad18 guides poleta to replication stalling sites through physical interaction and PCNA monoubiquitination. *Embo J.* 23:3886-96.
- Waters, L.S., B.K. Minesinger, M.E. Wiltrout, S. D'Souza, R.V. Woodruff, and G.C. Walker. 2009. Eukaryotic translesion polymerases and their roles and regulation in DNA damage tolerance. *Microbiol Mol Biol Rev.* 73:134-54.
- Waters, L.S., and G.C. Walker. 2006. The critical mutagenic translesion DNA polymerase Rev1 is highly expressed during G(2)/M phase rather than S phase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103:8971-6.
- Watson, N.B., E. Nelson, M. Digman, J.A. Thornburg, B.W. Alphenaar, and W.G. McGregor. 2008. RAD18 and associated proteins are immobilized in nuclear foci in human cells entering S-phase with ultraviolet light-induced damage. *Mutat Res.* 648:23-31.
- Watts, F.Z. 2006. Sumoylation of PCNA: Wrestling with recombination at stalled replication forks. *DNA Repair (Amst).* 5:399-403.
- Weaver, D.T., and M.L. DePamphilis. 1982. Specific sequences in native DNA that arrest synthesis by DNA polymerase alpha. *J Biol Chem.* 257:2075-86.
- Weitzmann, M.N., K.J. Woodford, and K. Usdin. 1997. DNA secondary structures and the evolution of hypervariable tandem arrays. *J Biol Chem.* 272:9517-23.
- Wilson, T.M., A. Vaisman, S.A. Martomo, P. Sullivan, L. Lan, F. Hanaoka, A. Yasui, R. Woodgate, and P.J. Gearhart. 2005. MSH2-MSH6 stimulates DNA polymerase eta, suggesting a role for A:T mutations in antibody genes. *J Exp Med.* 201:637-45.
- Wold, M.S. 1997. Replication protein A: a heterotrimeric, single-stranded DNA-binding protein required for eukaryotic DNA metabolism. *Annu Rev Biochem.* 66:61-92.
- Wofle, W.T., M.T. Washington, L. Prakash, and S. Prakash. 2003. Human DNA polymerase kappa uses template-primer misalignment as a novel means for extending mispaired termini and for generating single-base deletions. *Genes Dev.* 17:2191-9.
- Wood, A., P. Garg, and P.M. Burgers. 2007. A ubiquitin-binding motif in the translesion DNA polymerase Rev1 mediates its essential functional interaction with ubiquitinated proliferating cell nuclear antigen in response to DNA damage. *J Biol Chem.* 282:20256-63.
- Wood, M.L., A. Esteve, M.L. Morningstar, G.M. Kuziemko, and J.M. Essigmann. 1992. Genetic effects of oxidative DNA damage: comparative mutagenesis of 7,8-dihydro-8-oxoguanine and 7,8-dihydro-8-oxoadenine in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res.* 20:6023-32.

- Woodford, K.J., R.M. Howell, and K. Usdin. 1994. A novel K(+)-dependent DNA synthesis arrest site in a commonly occurring sequence motif in eukaryotes. *J Biol Chem.* 269:27029-35.
- Wu, H.I., J.A. Brown, M.J. Dorie, L. Lazzeroni, and J.M. Brown. 2004. Genome-wide identification of genes conferring resistance to the anticancer agents cisplatin, oxaliplatin, and mitomycin C. *Cancer Res.* 64:3940-8.
- Wu, L., and I.D. Hickson. 2006. DNA helicases required for homologous recombination and repair of damaged replication forks. *Annu Rev Genet.* 40:279-306.
- Wyka, I.M., K. Dhar, S.K. Binz, and M.S. Wold. 2003. Replication protein A interactions with DNA: differential binding of the core domains and analysis of the DNA interaction surface. *Biochemistry.* 42:12909-18.
- Yamashita, Y.M., T. Okada, T. Matsusaka, E. Sonoda, G.Y. Zhao, K. Araki, S. Tateishi, M. Yamaizumi, and S. Takeda. 2002. RAD18 and RAD54 cooperatively contribute to maintenance of genomic stability in vertebrate cells. *Embo J.* 21:5558-66.
- Yan, S., and W.M. Michael. 2009. TopBP1 and DNA polymerase alpha-mediated recruitment of the 9-1-1 complex to stalled replication forks: implications for a replication restart-based mechanism for ATR checkpoint activation. *Cell Cycle.* 8:2877-84.
- Yang, I.Y., H. Miller, Z. Wang, E.G. Frank, H. Ohmori, F. Hanaoka, and M. Moriya. 2003. Mammalian translesion DNA synthesis across an acrolein-derived deoxyguanosine adduct. Participation of DNA polymerase eta in error-prone synthesis in human cells. *J Biol Chem.* 278:13989-94.
- Yang, W. 2003. Damage repair DNA polymerases Y. *Curr Opin Struct Biol.* 13:23-30.
- Yang, X.H., B. Shiotani, M. Classon, and L. Zou. 2008. Chk1 and Claspin potentiate PCNA ubiquitination. *Genes Dev.* 22:1147-52.
- Yang, X.H., and L. Zou. 2009. Dual functions of DNA replication forks in checkpoint signaling and PCNA ubiquitination. *Cell Cycle.* 8:191-4.
- Yoon, J.H., L. Prakash, and S. Prakash. 2009. Highly error-free role of DNA polymerase eta in the replicative bypass of UV-induced pyrimidine dimers in mouse and human cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 106:18219-24.
- Yoshimura, A., K. Nishino, J. Takezawa, S. Tada, T. Kobayashi, E. Sonoda, T. Kawamoto, S. Takeda, Y. Ishii, K. Yamada, T. Enomoto, and M. Seki. 2006. A novel Rad18 function involved in protection of the vertebrate genome after exposure to camptothecin. *DNA Repair (Amst).* 5:1307-16.
- Yoshimura, A., M. Seki, M. Kanamori, S. Tateishi, T. Tsurimoto, S. Tada, and T. Enomoto. 2009. Physical and functional interaction between WRNIP1 and RAD18. *Genes Genet Syst.* 84:171-8.
- Yu, C.E., J. Oshima, Y.H. Fu, E.M. Wijsman, F. Hisama, R. Alisch, S. Matthews, J. Nakura, T. Miki, S. Ouais, G.M. Martin, J. Mulligan, and G.D. Schellenberg. 1996. Positional cloning of the Werner's syndrome gene. *Science.* 272:258-62.
- Yu, Y., W. Wang, Q. Ding, R. Ye, D. Chen, D. Merkle, D. Schriemer, K. Meek, and S.P. Lees-Miller. 2003. DNA-PK phosphorylation sites in XRCC4 are not required for survival after radiation or for V(D)J recombination. *DNA Repair (Amst).* 2:1239-52.
- Yuasa, M., C. Masutani, T. Eki, and F. Hanaoka. 2000. Genomic structure, chromosomal localization and identification of mutations in the xeroderma pigmentosum variant (XPV) gene. *Oncogene.* 19:4721-8.
- Yuasa, M.S., C. Masutani, A. Hirano, M.A. Cohn, M. Yamaizumi, Y. Nakatani, and F. Hanaoka. 2006. A human DNA polymerase eta complex containing Rad18, Rad6 and Rev1; proteomic analysis and targeting of the complex to the chromatin-bound fraction of cells undergoing replication fork arrest. *Genes Cells.* 11:731-44.

- Zeng, X., G.A. Negrete, C. Kasmer, W.W. Yang, and P.J. Gearhart. 2004. Absence of DNA polymerase eta reveals targeting of C mutations on the nontranscribed strand in immunoglobulin switch regions. *J Exp Med.* 199:917-24.
- Zeng, X., D.B. Winter, C. Kasmer, K.H. Kraemer, A.R. Lehmann, and P.J. Gearhart. 2001. DNA polymerase eta is an A-T mutator in somatic hypermutation of immunoglobulin variable genes. *Nat Immunol.* 2:537-41.
- Zhang, J., H. Willers, Z. Feng, J.C. Ghosh, S. Kim, D.T. Weaver, J.H. Chung, S.N. Powell, and F. Xia. 2004. Chk2 phosphorylation of BRCA1 regulates DNA double-strand break repair. *Mol Cell Biol.* 24:708-18.
- Zhang, S., J. Chea, X. Meng, Y. Zhou, E.Y. Lee, and M.Y. Lee. 2008. PCNA is ubiquitinated by RNF8. *Cell Cycle.* 7.
- Zhang, Y., X. Wu, O. Rechkoblit, N.E. Geacintov, J.S. Taylor, and Z. Wang. 2002. Response of human REV1 to different DNA damage: preferential dCMP insertion opposite the lesion. *Nucleic Acids Res.* 30:1630-8.
- Zhang, Y., F. Yuan, X. Wu, O. Rechkoblit, J.S. Taylor, N.E. Geacintov, and Z. Wang. 2000a. Error-prone lesion bypass by human DNA polymerase eta. *Nucleic Acids Res.* 28:4717-24.
- Zhang, Y., F. Yuan, X. Wu, M. Wang, O. Rechkoblit, J.S. Taylor, N.E. Geacintov, and Z. Wang. 2000b. Error-free and error-prone lesion bypass by human DNA polymerase kappa in vitro. *Nucleic Acids Res.* 28:4138-46.
- Zhang, Y., F. Yuan, X. Wu, and Z. Wang. 2000c. Preferential incorporation of G opposite template T by the low-fidelity human DNA polymerase iota. *Mol Cell Biol.* 20:7099-108.
- Zhang, Y., F. Yuan, H. Xin, X. Wu, D.K. Rajpal, D. Yang, and Z. Wang. 2000d. Human DNA polymerase kappa synthesizes DNA with extraordinarily low fidelity. *Nucleic Acids Res.* 28:4147-56.
- Zhao, B., M.J. Bower, P.J. McDevitt, H. Zhao, S.T. Davis, K.O. Johanson, S.M. Green, N.O. Concha, and B.B. Zhou. 2002. Structural basis for Chk1 inhibition by UCN-01. *J Biol Chem.* 277:46609-15.
- Zheng, H., X. Wang, A.J. Warren, R.J. Legerski, R.S. Nairn, J.W. Hamilton, and L. Li. 2003. Nucleotide excision repair- and polymerase eta-mediated error-prone removal of mitomycin C interstrand cross-links. *Mol Cell Biol.* 23:754-61.
- Zhou, B.B., P. Chaturvedi, K. Spring, S.P. Scott, R.A. Johanson, R. Mishra, M.R. Mattern, J.D. Winkler, and K.K. Khanna. 2000. Caffeine abolishes the mammalian G(2)/M DNA damage checkpoint by inhibiting ataxia-telangiectasia-mutated kinase activity. *J Biol Chem.* 275:10342-8.
- Zhou, B.L., J.D. Pata, and T.A. Steitz. 2001. Crystal structure of a DinB lesion bypass DNA polymerase catalytic fragment reveals a classic polymerase catalytic domain. *Mol Cell.* 8:427-37.
- Zhuang, J., J. Zhang, H. Willers, H. Wang, J.H. Chung, D.C. van Gent, D.E. Hallahan, S.N. Powell, and F. Xia. 2006. Checkpoint kinase 2-mediated phosphorylation of BRCA1 regulates the fidelity of nonhomologous end-joining. *Cancer Res.* 66:1401-8.
- Zhuang, Z., R.E. Johnson, L. Haracska, L. Prakash, S. Prakash, and S.J. Benkovic. 2008. Regulation of polymerase exchange between Pol eta and Pol delta by monoubiquitination of PCNA and the movement of DNA polymerase holoenzyme. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 105:5361-6.
- Ziv, O., N. Geacintov, S. Nakajima, A. Yasui, and Z. Livneh. 2009. DNA polymerase zeta cooperates with polymerases kappa and iota in translesion DNA synthesis across pyrimidine photodimers in cells from XPV patients. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 106:11552-7.
- Zou, L., and S.J. Elledge. 2003. Sensing DNA damage through ATRIP recognition of RPA-ssDNA complexes. *Science.* 300:1542-8.

Zou, Y., Y. Liu, X. Wu, and S.M. Shell. 2006. Functions of human replication protein A (RPA): from DNA replication to DNA damage and stress responses. *J Cell Physiol.* 208:267-73.