



HAL
open science

L'hétérotrimère XPC/Rad23B/centrine 2 : un complexe multifonctionnel dans la réponse cellulaire humaine aux agents génotoxiques

Emilie Renaud

► To cite this version:

Emilie Renaud. L'hétérotrimère XPC/Rad23B/centrine 2 : un complexe multifonctionnel dans la réponse cellulaire humaine aux agents génotoxiques. Biochimie [q-bio.BM]. Université Paris DESCARTES, 2008. Français. NNT : . tel-00432991

HAL Id: tel-00432991

<https://theses.hal.science/tel-00432991>

Submitted on 17 Nov 2009

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

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

THÈSE

pour obtenir le grade de

DOCTEUR

Sciences de la Vie et de la Santé

**Ecole Doctorale : Génétique, Cellule, Immunologie, Infectiologie,
Développement**

Discipline : Biologie cellulaire et moléculaire

présentée et soutenue publiquement

par M^{elle} Emilie RENAUD

le 3 Octobre 2008

**L'hétérotrimère XPC/Rad23B/centrine 2 : un complexe
multifonctionnel dans la réponse cellulaire humaine aux
agents génotoxiques**

Jury :

Dr. Jacques TRETON (Président)

Dr. Jaime F. ANGULO-MORA (Directeur de thèse)

Dr. Evelyne SAGE (Rapporteur)

Dr. Guy KERYER (Rapporteur)

Dr. Françoise DANTZER (Examineur)

Dr. Alain SARASIN (Examineur)

Remerciements

Au Docteur Jacques Treton qui me fait l'honneur de présider mon jury de thèse.

Aux Docteurs Guy Keryer et Evelyne Sage d'avoir accepté avec gentillesse la fonction de rapporteur.

Aux Docteurs Françoise Dantzer et Alain Sarasin, examinateurs de ma thèse.

A Jaime, qui m'aura épaulé pendant ces quatre années de thèse. Il m'aura laissé une grande liberté dans le cheminement de ma thèse tout en sachant me guider aux moments opportuns.

Je remercie chaleureusement Gil Craescu, Jean-Baptiste Charbonnier et leurs équipes pour notre collaboration originale et fructueuse qui m'a permis de faire le lien entre différents domaines de la biologie. Je remercie également le laboratoire d'Andrew Rainbow pour leurs expérimentations d'HCR.

Je remercie tout particulièrement Fabrice Cordelières, responsable de la plateforme d'imagerie de l'Institut Curie à Orsay, qui aura été d'une grande aide technique, scientifique et morale.

Je remercie vivement Michel Bornens, Juliette Azimzadeh, Anne-Marie Tassin et Annie Delouée de m'avoir accueillie dans leur laboratoire à l'Institut Curie Paris, de m'avoir gracieusement donné tous les anticorps dont j'avais besoin et pour leurs conseils avisés sur ce domaine qui m'était alors inconnu, la biologie du centrosome. Cette collaboration a été extrêmement enrichissante.

Je remercie Hanspeter Naegeli pour nos discussions scientifiques et nos échanges très utiles.

Je tiens à exprimer ma gratitude à mes collègues du LGR pour leur accueil et leur soutien. Je garderai un grand souvenir du bureau que j'aurai partagé avec Laurent (toujours avec les étudiantes...), Karène, Emma et Katerina (pas tous à la fois).

Je remercie le Commissariat à l'Energie Atomique et la Fondation pour la Recherche Médicale pour avoir contribué au financement de ce travail.

Un grand merci à ma famille et à mes amis, avec une mention particulière à Bertrand.

A mes grand-mères

Abréviations	10
Introduction	12
1. La Réparation par Excision de Nucléotides	14
1.1. Introduction générale.....	14
1.2. La Réparation par Excision de Nucléotides	18
1.2.1. Lésions prises en charge par le NER.....	18
1.2.2. Mécanisme du NER	21
1.3. Régulation du NER	29
1.3.1. Régulation transcriptionnelle	29
1.3.2. Modifications post-traductionnelles	30
1.3.3. Remodelage de la chromatine	32
1.4. Maladies associées à un défaut du NER.....	33
1.4.1. Xeroderma Pigmentosum (XP)	34
1.4.2. Le syndrome de Cockayne (CS).....	36
1.4.3. La Trichothiodystrophie (TTD)	37
1.5. Les protéines Rad23 dans l'initiation du GG-NER et la voie de l'ubiquitine.....	38
1.5.1. Rôles de la protéine rad23 chez la levure <i>S.cerevisiae</i>	38
1.5.2. Rôles des protéines Rad23A&B chez les mammifères	39
1.6. Autres fonctions de XPC dans le métabolisme cellulaire	43
1.6.1. Signalisation et réponse au stress génotoxique	43
1.6.2. Autres voies de réparation.....	43
2. Le centrosome	45
2.1. Structure du centrosome.....	45
2.2. Le cycle du centrosome.....	47
2.3. Les fonctions du centrosome.....	49
2.3.1. Organisation des MTs	51
2.3.2. Fuseau mitotique et cytokinèse	51
2.3.3. Transition G1/S	52
2.3.4. Transition G2/M.....	53
2.3.5. Le rôle central de CDK2 dans le lien entre les deux cycles.....	53
2.3.6. L'activité protéasomale au centrosome.....	54
2.3.7. Le centrosome dans la réponse aux dommages de l'ADN.....	54
2.4. Centrosome et cancer	56
2.4.1. L'amplification du centrosome : types de défauts.....	56
2.4.2. L'amplification du centrosome et la dérégulation des points de contrôle.....	57
2.4.3. L'amplification du centrosome, l'instabilité génétique et l'aneuploïdie.....	58
2.5. La centrine.....	59
2.5.1. La centrine chez les eucaryotes inférieurs.....	59
2.5.2. Localisation et structure de la centrine 2 humaine	62
2.5.3. Fonctions de la centrine 2 humaine.....	64
3. L'interaction XPC/centrine 2	68
3.1. Première étude.....	68
3.2. Analyses structurales.....	69
3.3. Rôle de l'interaction XPC/centrine 2 ?	71
3.3.1. Etude chez <i>S.cerevisiae</i>	71
3.3.2. Etude chez <i>A.thaliana</i>	71
3.3.3. Etude chez l'homme.....	72
Objectifs de la thèse	74
Résultats	76

Article 1 : caractérisation moléculaire et cellulaire de l'interaction XPC/centrine 2..	76
Présentation et résumé des résultats de l'article	76
Les résidus W848 et L851 sont critiques pour l'interaction <i>in vitro</i>	76
La liaison de la centrine 2 au Ca ²⁺ détermine le mode d'interaction avec XPC	77
La région de XPC N847-R863 possède une seconde face hydrophobe	78
La surexpression de XPC induit une augmentation de la centrine 2 dans le noyau des cellules	78
La relocalisation de la centrine 2 dépend du résidu W848 de XPC	79
Conclusion de l'article	79
Résultats additionnels de l'article 1	100
XPC interagit directement avec la centrine 2, mais pas avec la centrine 3	100
La surexpression de XPC entraîne un transfert de la centrine 2 cytoplasmique dans le noyau	101
Le complexe XPC/centrine 2 est localisé aux sites des dommages induits par les UVC	102
L'inhibition de l'interaction entre XPC et la centrine 2 ne modifie pas les cinétiques de recrutement de XPC aux photodommages	104
Conclusion	107
Article 2 : Contributions relatives de XPC, Rad23A, Rad23B et de la centrine 2 dans la réponse cellulaire humaine aux ultraviolets	108
Présentation et résumé des résultats de l'article	108
La réduction de Rad23B ou XPC entraîne une sensibilisation aux UVC et aux RI	108
Les cellules XPC ^{KD} et Rad23 ^{KD} montrent une réduction de leur activité de réparation de l'ADN viral irradié aux UVC	109
La réduction de la quantité de XPC modifie le niveau basal et la distribution subcellulaire de la centrine 2	111
La centrine 2 est localisée aux zones nucléaires endommagées dans les cellules Rad23 ^{KD}	111
Conclusion de l'article	111
Résultats additionnels de l'article 2	159
La reconnaissance des lésions par XPC est fonctionnelle dans les cellules Rad23 ^{KD} ...	159
XPC et la centrine 2 sont recrutées sur les lésions en amont de XPA	160
La centrine 2 s'accumule dans les noyaux de cellules XPA ^{KD} irradiées aux UVC	161
La réduction de la protéine XPC modifie la distribution subcellulaire d'AKAP450	162
Partie 3 : L'équilibre centrosome/noyau de la centrine 2 et l'accumulation du transcrit après une irradiation aux UVC dépendent de la présence de XPC	165
Le niveau basal de la protéine centrine 2 augmente dans les cellules complémentées par XPC	165
La distribution subcellulaire de la centrine 2 est perturbée dans les cellules XP44RO. ...	167
La complémentation des cellules XP-C restaure la localisation du complexe XPC/centrine 2 sur les zones nucléaires endommagées	171
La présence de XPC entraîne l'accumulation des transcrits de kin17, Rad23B et centrine 2 après une irradiation aux UVC	172
Conclusions	173
Discussion	175
L'interaction XPC/centrine 2 : rôle dans l'équilibre centrosome/noyau de la centrine 2	175
<i>Un mode d'interaction très conservé parmi les centriques</i>	175
<i>La substitution d'un seul résidu de XPC inhibe l'interaction in vivo</i>	177
<i>XPC et la centrine 2 forment un complexe ancré à la chromatine</i>	178

<i>La présence de XPC détermine le niveau basal de la protéine centrine 2</i>	179
<i>La présence de XPC détermine la distribution subcellulaire de la centrine 2</i>	180
La reconnaissance des lésions de l'ADN lors du GG-NER	182
<i>Le complexe XPC/centrine 2 s'accumule sur les sites des dommages nucléaires</i>	183
<i>Le variant XPC(W690S) mais pas XPC(W848A) présente un défaut de recrutement sur des photodommages</i>	184
<i>Le complexe XPC/centrine 2 se localise sur les dommages quand les concentrations des protéines Rad23 sont réduites</i>	187
<i>Identification de nouveaux facteurs induits après la reconnaissance des dommages par XPC : la centrine 2 et Rad23B</i>	188
Rôle des protéines Rad23A et Rad23B dans la réponse cellulaire humaine aux UV .	189
<i>La protéine Rad23B joue un rôle dans la survie cellulaire à long terme</i>	189
<i>La protéine Rad23A est requise pour la réparation de l'ADN indépendamment de XPC</i>	191
Conclusion	193
Perspectives	197
Matériel et Méthodes	199
Fractionnement cellulaire	199
Irradiation localisée aux UVC.....	200
qPCR	200
Anticorps	201
Imagerie confocale	202
Microirradiation laser	202
Références bibliographiques	205

Abréviations

6,4-PP	<i>pyrimidine(6,4)pyrimidone</i>
Γ-H2AX	<i>forme phosphorylée de l'histone H2AX</i>
Γ-TuRC	<i>γ-tubulin ring complex</i>
AKAP	<i>A kinase anchor protein</i>
ATM	<i>ataxia telangiectasia mutated</i>
ATR	<i>ATM Rad3-related protein</i>
BER	<i>base excision repair</i>
BRCA1/2	<i>breast cancer associated protein 1/2</i>
CDC	<i>cell division cycle</i>
Chk	<i>checkpoint kinase</i>
CDK	<i>cycline dépendante des kinases</i>
C-nap	<i>centrosomal nek2-associated protein</i>
CS	<i>syndrome de Cockayne</i>
CSA et B	<i>goupes de complémentation de CS</i>
CSN	<i>signalosome COP9</i>
CPD	<i>cyclobutane pyrimidine dimer</i>
DDB	<i>DNA damage-binding protein</i>
DSB	<i>double strand break</i>
ERCC	<i>excision repair cross-complementing</i>
FRAP	<i>fluorescence recovery after photobleaching</i>
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
GG-NER	<i>global genome-NER</i>
HR	<i>homologous recombination</i>
ITC	<i>isothermal titration calorimetry</i>
Kar1	<i>karyogamy 1</i>
KD/KO	<i>knock-down/knock-out</i>
MEF	<i>mouse embryonic fibroblasts</i>
MMR	<i>mismatch repair</i>
Mps	<i>monopolar spindle protein</i>
MT	<i>microtubules</i>
MTOC	<i>microtubules organisation center</i>
NEF	<i>nucleotide excision repair factor</i>

Nek2	<i>nimA-related protein kinase 2</i>
NER	<i>nucleotide excision repair</i>
NHEJ	<i>non-homologous end joining</i>
NLS	<i>nuclear localization signal</i>
Nup	<i>nucléoporine</i>
OGG	<i>8-oxoguanine DNA glycosylase</i>
PARP	<i>poly(ADP-ribose) polymerase</i>
PCNA	<i>proliferating cell nuclear antigen</i>
PCM	<i>pericentriolar material</i>
Rb	<i>retinoblastoma</i>
RFC	<i>replication factor C</i>
RI	<i>rayonnements ionisants</i>
RMN	<i>résonance magnétique nucléaire</i>
RNAPolII	<i>RNA polymerase II</i>
ROS	<i>reactive oxygen species</i>
RPA	<i>replication protein A</i>
Sac3	<i>protéine associée aux pores nucléaires</i>
Sfi1	<i>suppresseur de fill</i>
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
SPB	<i>spindle pole body</i>
SWI/SNF	<i>complexe de remodelage de la chromatine</i>
TC-NER	<i>réparation couplée à la transcription</i>
TDG	<i>thymine DNA glycosylase</i>
TLS	<i>translesion synthesis</i>
TFIIH	<i>transcription factor IIH</i>
TTD	<i>trichothiodystrophie</i>
UB1	<i>ubiquitin-like domain</i>
UBA	<i>ubiquitin associated domain</i>
UDS	<i>unscheduled DNA synthesis</i>
XP	<i>xeroderma pigmentosum</i>
XP-V	<i>variant de XP</i>
XP-A à XP-G	<i>groupes de complémentation de XP</i>
XPA à XPG	<i>facteurs protéiques du NER</i>
UV	<i>ultraviolets</i>

Introduction

Il y a plus d'un demi-siècle, il a été admis que la molécule d'ADN était le support de l'information génétique, donc de l'hérédité. James Watson et Francis Crick ont alors émis l'hypothèse que des erreurs pourraient apparaître lors de sa réplication, provoquant l'apparition de mutations dans la nouvelle génération de cellules (Crick, 1974). Pourtant, la notion de réparation de l'ADN, indispensable au métabolisme cellulaire de tous les êtres vivants, apparut plus tardivement. Ainsi, en 1974, quand Francis Crick revint sur ses années de découverte, il dit :

« Nous avons ignoré le rôle possible de la réparation de l'ADN... J'ai finalement réalisé que l'ADN était tellement précieux qu'il devait exister plusieurs mécanismes permettant de le réparer. »

L'ADN est constamment altéré, aussi bien par le métabolisme cellulaire que par des sources exogènes. Par exemple, en 24 heures dans chaque cellule d'un être humain, en moyenne 18 000 résidus de purine sont hydrolysés et doivent être remplacés. L'ADN endommagé doit être réparé afin d'éviter la persistance de mutations et de conserver la stabilité génétique du génome. En effet, des mutations dans la lignée somatique peuvent avoir de nombreuses conséquences phénotypiques comme l'apparition de cancers ou le vieillissement. De plus, bien que la diversité génétique dans la lignée germinale soit nécessaire pour permettre la sélection génétique basée sur l'évolution, certaines mutations germinales sont responsables de maladies génétiques (Friedberg, 2001).

La réparation de l'ADN est une composante de la réponse cellulaire aux dommages de l'ADN. Cette réponse résulte de l'activité d'un réseau de voies de signalisation (Figure 1 ; Zhou et Elledge, 2000). D'une manière simplifiée, après la formation de dommages sur l'ADN, des voies de signalisation désignées comme points de contrôle sont activées.

L'activation des points de contrôle implique que des signaux soient perçus par des détecteurs, que ces signaux soient transmis et qu'une réponse adaptée soit mise en place par des effecteurs, comme l'arrêt du cycle cellulaire, la transcription de gènes et la réparation de l'ADN. Dans certains cas extrêmes, la mort cellulaire sera déclenchée.

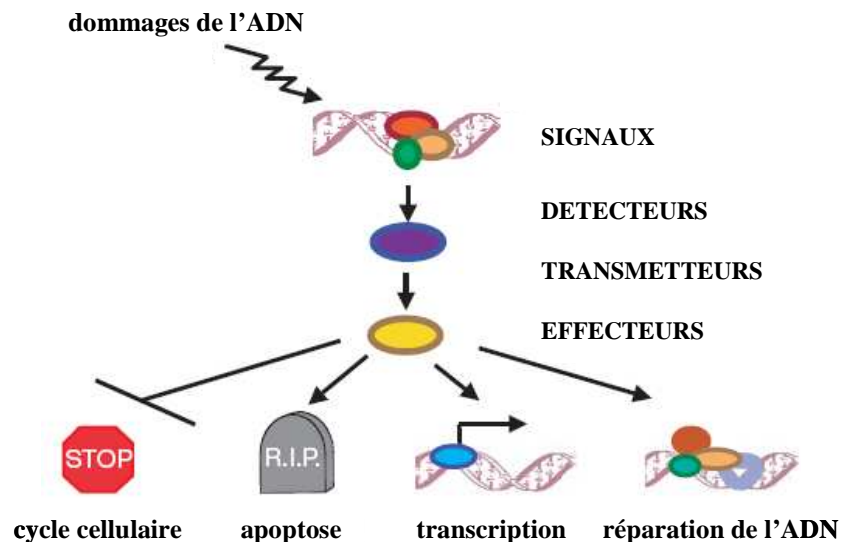


Figure 1. La réponse cellulaire aux dommages de l'ADN. Elle nécessite la mise en place d'un réseau de signalisation, allant de détecteurs de signaux jusqu'à des effecteurs qui organisent les mécanismes de réponse aux dommages de l'ADN. Les détecteurs sont peu connus. Les transducteurs peuvent être des protéines kinase comme ATM et ATR qui activent en phosphorylant d'autres kinases Chk1 et Chk2. Les substrats de ces protéines kinases, les effecteurs, sont impliqués dans la réparation de l'ADN, le contrôle du cycle cellulaire et la régulation transcriptionnelle. Ce sont par exemple p53, BRCA1 et Cdc25C. (d'après Zhou et Elledge, 2000)

Au cours de ma thèse, je me suis intéressée à la protéine humaine XPC. Elle est impliquée dans la reconnaissance d'un grand nombre de lésions de l'ADN, cette activité étant nécessaire au déclenchement d'une sous-voie de la réparation par excision de nucléotides (NER, « Nucleotide Excision Repair »). Cette voie de réparation de l'ADN est particulièrement importante parce qu'elle permet la réparation de lésions induites par divers carcinogènes environnementaux et les ultraviolets.

XPC forme un complexe avec Rad23B et il a été montré qu'elle interagissait avec la centrine 2. Rad23B joue un rôle dans la stabilité/dégradation des protéines et la centrine 2 régule la division cellulaire lors du cycle du centrosome. Je développerai d'une part la réparation de l'ADN et le NER en insistant sur les rôles de XPC et Rad23B. D'autre part, le centrosome et ses fonctions seront présentés. Enfin, une attention particulière sera portée sur l'interaction entre XPC et la centrine 2.

1. La Réparation par Excision de Nucléotides

1.1. Introduction générale

La réponse cellulaire aux génotoxiques est un mécanisme de défense indispensable au maintien de l'intégrité génétique. Au sein de cette réponse, la réparation de l'ADN participe activement à l'évitement de l'accumulation de mutations dans le génome qui pourraient être responsable de l'apparition de cancers.

L'ADN peut être endommagé directement par le métabolisme cellulaire à cause :

- d'erreurs survenant pendant la réplication
- de modifications spontanées de bases
- des espèces réactives de l'oxygène (ROS, « Reactive Oxygen Species ») issues du métabolisme oxydatif et qui réagissent très fortement avec l'ADN.

L'ADN peut également être altéré par des éléments exogènes tels que :

- les radiations ionisantes (RI), pouvant agir directement (l'ADN absorbe l'énergie de la radiation) ou indirectement (l'ADN réagit avec des molécules ionisées)
- les rayonnements ultraviolets (UV), provoquant la formation de photoproduits
- divers agents chimiques trouvés dans l'environnement ou utilisés en chimiothérapie, pouvant induire des modifications de base, des cassures, ou former des adduits sur l'ADN.

Les dommages peuvent soit provoquer un blocage de la réplication ou de la transcription, soit être reconnus dans le génome par des protéines spécialisées. Outre la réparation des lésions, au niveau du blocage des fourches de réplication, des polymérases spécialisées ζ , κ ou η peuvent prendre le relais des polymérases réplicatives et accomplir une synthèse appelée translésionnelle.

Diverses sources peuvent induire une grande variété de types de lésions (Figure 2), pouvant aller de simples mésappariements ou sites abasiques à des dommages plus complexes comme la formation d'adduits de molécules sur l'ADN, des dimères de pyrimidines... La sévérité et l'étendue des dommages détermineront le type de réponse de la cellule face à cette menace : la survie ou la mort cellulaire. Le déclenchement de l'apoptose, par exemple en présence excessive de dommages, permet d'éviter l'accumulation de mutations dans le génome. Quand la cellule peut réparer, elle induira un arrêt à certaines phases du cycle cellulaire via l'activation de points de contrôle, ce qui empêchera une nouvelle division tant que les dommages ne sont pas réparés. Malheureusement une réparation infidèle ou la présence trop importante de dommages pourront entraîner l'accumulation de mutations ou la formation d'aberrations chromosomiques qui, à plus long terme, pourront induire la transformation cellulaire.

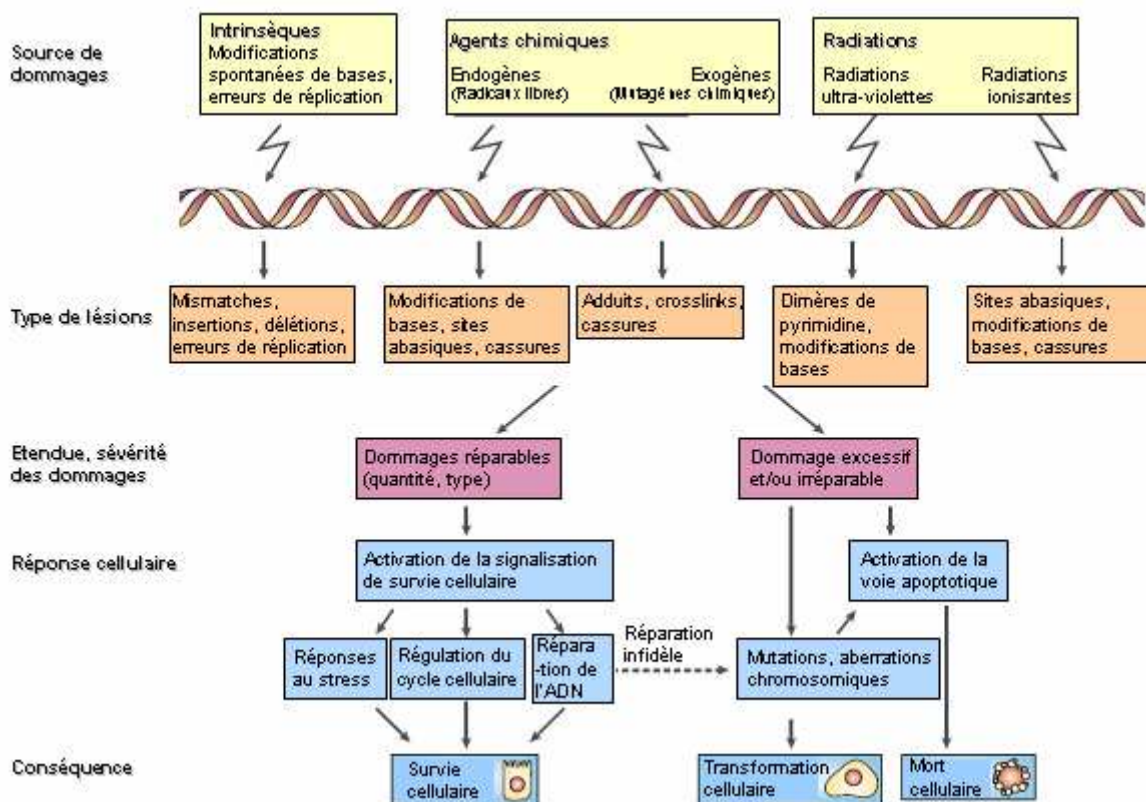


Figure 2. Différents types de réponse peuvent être associés à la formation de lésions sur l'ADN. La cause et le type de dommages sont variés, et en fonction de leur sévérité et de leur étendue, la cellule pourra induire la survie ou la mort cellulaire. Cette survie dépend également de la fidélité de la réparation. Dans certains cas, l'apparition de mutations ou d'aberrations chromosomiques entraînera la transformation cellulaire, qui pourra être responsable de l'apparition de cancers. (D'après Rich et al, 2000)

Cette forte hétérogénéité de lésions implique l'existence de différents mécanismes de réparation de l'ADN qui couvrent la majorité des dommages. Chez l'homme, il existe cinq voies de réparation (Figure 3), mais certaines lésions peuvent être reversées en une seule étape : c'est le cas des bases *O*-alkylées comme la *O*⁶-méthylguanine (*O*⁶MeG) (Christmann et al, 2003). L'*O*⁶MeG peut être directement prise en charge par une enzyme appelée *O*⁶MeG-DNA méthyl-transférase (MGMT), qui transfère le groupement méthyl de la guanine alkylée sur un résidu cystéine de son site actif.

La réparation des dommages simple-brin implique l'excision de la base ou du nucléotide endommagé, suivie de la resynthèse nucléotidique en regard du brin complémentaire. La réparation par excision de bases (BER, « Base Excision Repair ») corrige les bases modifiées comme les bases oxydées ou méthylées. Elles sont reconnues et hydrolysées par des enzymes spécifiques, les glycosylases. Le NER permet la réparation d'une grande variété de lésions induisant une forte distorsion de l'ADN. Les plus connues sont les photoproduits générés suite à une exposition aux UV. Dans ce cas, les dommages sont éliminés par excision d'un oligonucléotide. La réparation a lieu sur le brin des gènes en cours de transcription (TC-NER, « Transcription Coupled-NER ») ou sur l'ensemble du génome indépendamment de la transcription (GG-NER, « Global Genome-NER »). La réparation de mésappariements (MMR, « MisMatch Repair ») permet principalement la correction d'erreurs apparues au cours de la réplication, aussi bien l'incorporation d'un mauvais nucléotide que l'insertion ou la délétion de nucléotides provoquant la formation de boucles. La base est excisée puis le site abasique résultant est réparé par le BER.

Les cassures double-brin (DSB ; « Double Strand Break ») sont générées directement par des agents chimiques ou physiques, ou après blocage de la fourche de réplication. Le blocage des fourches peut résulter de leur collision avec des complexes ternaires tels que le complexe de clivage ADN/Topoisomérase I piégé par la camptothécine (Pommier et al, 2003). Les DSB peuvent être à l'origine de perte d'information génétique et de cassures chromosomiques. Leur réparation fait appel à la recombinaison avec un brin d'ADN homologue ou non. Chez l'homme, la voie majeure de réparation des DSB est la jonction d'extrémités non homologues (NHEJ, « Non-Homologous End Joining ») qui permet la ligation de brins d'ADN sans homologie de séquence, pouvant entraîner une réparation infidèle. Lors de la recombinaison homologue (HR, « Homologous Recombination »), une

molécule d'ADN intacte et de séquence homologue va servir de substrat à la réparation. C'est un processus post-réplicatif et conservatif.

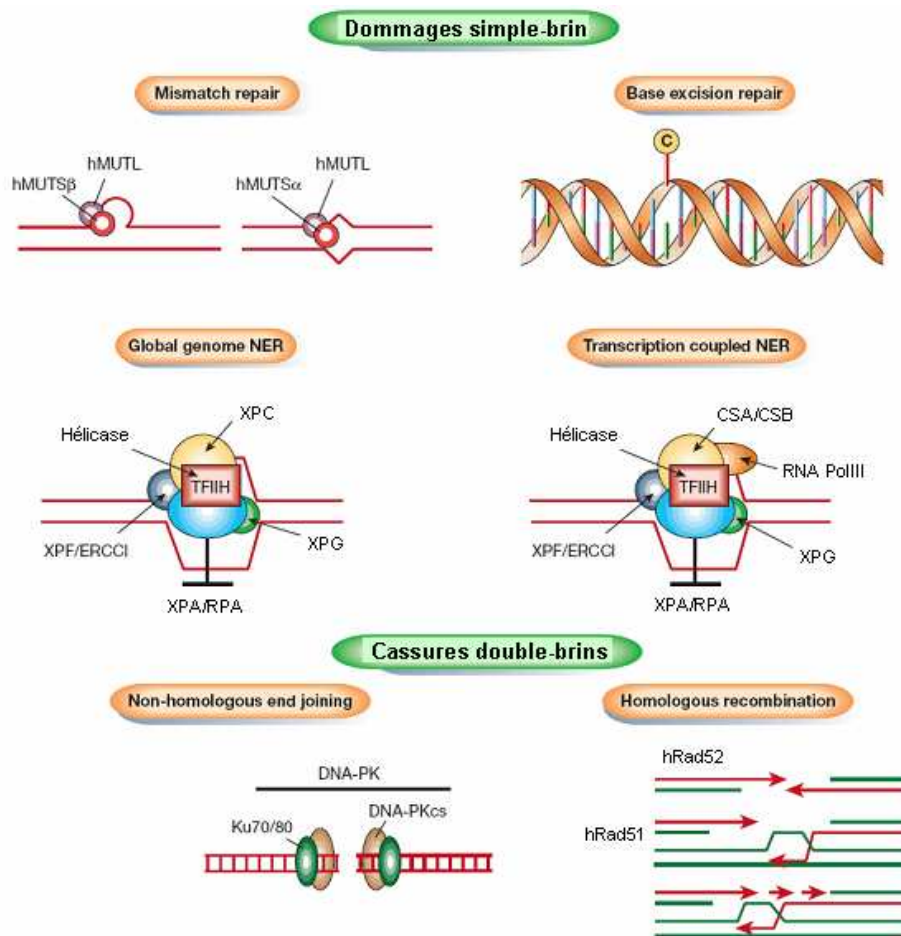


Figure 3. Représentation des différentes voies de réparation chez l'homme. **MMR** : les lésions sont reconnues par des hétérodimères spécifiques, par exemple hMutSβ/hMutL qui se fixe sur les boucles d'insertion/délétion ou hMutSα/hMutL qui reconnaît les mésappariements. **BER** : la base modifiée est reconnue par une glycosylase puis hydrolysée. **NER** : XPC (GG-NER) ou RNAPolIII/CSA/CSB (TC-NER) déclenchent la voie de réparation. **NHEJ** : l'hétérodimère Ku70/Ku80 stabilise les extrémités d'ADN et recrute la sous unité catalytique de la DNA-PK (DNA-PKcs). **HR** : hRad52 se fixe sur la cassure et hRad51 peut initier l'échange de brin. (D'après Rich et al, 2000)

Les systèmes de protection de l'ADN sont des facteurs essentiels dans la prévention du cancer. Des mutations au sein des gènes impliqués dans la régulation de la réponse aux dommages et dans la réparation proprement dite peuvent avoir des conséquences dramatiques, aussi bien pour les cellules somatiques que pour la lignée germinale. Dans les cellules somatiques, des gènes défectueux liés à la réparation sont retrouvés dans de nombreuses tumeurs. Seulement quatre à sept mutations dans ces gènes « clé » sont ainsi suffisantes pour induire la plupart des cancers (Sarasin, 2003). De plus, des mutations germinales peuvent être

responsables de maladies génétiques ou de la prédisposition à ces maladies. Il existe au moins quinze maladies héréditaires associées à des défauts de réparation de l'ADN (Lehmann, 2003). Dans ces maladies, le risque de cancer augmente et d'autres pathologies (système nerveux, vieillissement accéléré) peuvent être associées.

1.2. La Réparation par Excision de Nucléotides

En 1968, James Cleaver montra que la prédisposition au cancer de la peau et la sensibilité exacerbée au soleil de malades souffrant de la maladie génétique appelée Xeroderma Pigmentosum (XP) étaient dues à un défaut de réparation des dommages induits par les UV, c'est-à-dire à un défaut du NER (Cleaver, 1968; Friedberg, 2004). C'est la première fois qu'on associait un défaut de réparation à une maladie héréditaire humaine.

1.2.1. Lésions prises en charge par le NER

Le NER est une voie de réparation de l'ADN qui permet de corriger des lésions induites par des sources exogènes (principalement les UV et des agents chimiques), ainsi que certains dommages oxydatifs (Hoeijmakers, 2001). Ces lésions impliquent un ou plusieurs nucléotides, sont volumineuses, et peuvent être de structure variée (pour revue, Gillet et Schärer, 2006 ; Table 1).

1.2.1.1. Lésions causées par les UV

Le spectre UV (200-400 nm) est le plus dangereux et le plus mutagène du spectre solaire. Il est divisé en trois catégories : UVA (320-400 nm), UVB (290-320 nm) et UVC (200-290 nm). Les UVC, les plus énergétiques, sont arrêtés par la couche d'ozone. Les lésions causées par les UV sont appelées photoproduits. Ils résultent de la liaison covalente entre deux pyrimidines adjacentes sous forme principalement de dimères de type cyclobutane (CPD, « Cyclobutane Pyrimidine Dimers ») ou d'adduits pyrimidine (6,4) pyrimidone (6,4-PP). Les UVA peuvent également produire des bases oxydées comme la 8-oxo-guanine (Douki et al, 1999, Pfeifer et al, 2005). La variété des photolésions varie avec la longueur d'ondes (Cadet et al, 2005 ; Kuluncsics et al, 1999). La majorité des CPD sont généralement des dimères de thymine TT, mais il existe également des dimères CT ou TC, formés en

fonction de la longueur d'onde, de la dose et des séquences adjacentes. Les 6,4-PP impliquent des nucléotides TC, CC ou TT et représentent 25 à 30% du taux de CPD. Bien que ces deux dommages puissent être produits à la même longueur d'onde et sur le même substrat, les conséquences structurales sur l'ADN varient. Les CPD induisent une faible distorsion de l'ADN (maximum 30°) alors que les 6,4-PP imposent une forte courbure qui va entraîner une perte de l'appariement des bases au site de la lésion. La grande majorité des lésions produites par les UV sont des CPD, mais ils sont réparés moins efficacement que les 6,4-PP.

1.2.1.2. Lésions causées par des réactifs électrophiles

La plupart des carcinogènes sont des molécules électrophiles qui ont une affinité pour l'ADN double-brin et réagissent avec les atomes nucléophiles des résidus de l'ADN. Certaines lésions résultantes de ces réactions sont des substrats pour le NER (Table 1). Ce sont principalement des adduits de platine, des hydrocarbures aromatiques cycliques (induits par la fumée de cigarette) et des amines aromatiques. Comme pour les photoproduits, les variations structurales imposées par la lésion influencent directement l'efficacité de réparation : plus la déformation de l'ADN est volumineuse, meilleure est la réparation.

Table 1 : Diversité des lésions prises en charge par le NER. Ce tableau présente les différents types de modifications de l'ADN prises en charge par le NER, les déformations de la double hélice qu'elles entraînent ainsi que l'efficacité de réparation quand elle est connue. Abréviations : Mg, sillon majeur ; mg, sillon mineur ; del., délétion ; nd, non déterminé, B[a]P, benzo[a]pyrène ; B[c]Ph, benzo[c]phénanthrène ; AAF, acétylaminofluorène ; AF, aminofluorène ; PhIP, 2-amino-1-méthyl-6-phényl-imidazole[4,5-*b*]pyridine ; IQ, 2-amino-3-méthylimidazo-[4,5-*f*]quinoline ; APy, aminopyrène ; AB, aminobiphényle. Conformation **A** : l'adduit reste externe à la double hélice et l'appariement des bases est conservé. Conformation **B** : l'adduit s'intercale dans la double hélice d'ADN et déplace la base modifiée de sa position canonique avec perte de l'appariement. Conformation **B'** : l'adduit s'intercale dans la double hélice mais l'appariement est conservé (D'après Gillet et Schärer, 2006).

Lésions / Adduits	Structure de l'ADN	Taux de réparation
Lésions UV		
CPD	courbure : 7°-30° courbure du Mg relaxation : 9°	+/-
CPD : mésappariement GG	courbure >30°, flexibilité Mg augmenté, mg rétréci	+++
6,4-PP	courbure : 44°	+++
Adduits de platine		
cisplatine 1,2d(GpG) intra-brin	courbure : 30°-55° courbure du Mg, mg augmenté relaxation : 13°-25°	+/-
cisplatine 1,3-d(GpNpG) intra-brin	courbure : 20°-35° courbure Mg, mg augmenté relaxation : 19°-23° dénaturation locale sur 2 bp	+++
transplatine 1,3-intra-brin	courbure 60°, flexibilité dénaturation locale sur 4 bp	+++
bis-platine (PtPt) 1,3-intra-brin	courbure flexible non directionnelle petite distorsion locale pas de région simple brin	+/-
Hydrocarbures aromatiques polycycliques		
(+)- <i>trans</i> -B[a]P-dG : dC	A	+/-
(-)- <i>trans</i> -B[a]P-dG : dC		
(+)- <i>trans</i> -B[a]P-dG : del.	B	-
(-)- <i>trans</i> -B[a]P-dG : del.	pas de disruption des bases adjacentes	nd
(+)- <i>cis</i> -B[a]P-dG : dC	B	++
(-)- <i>cis</i> -B[a]P-dG : dC		+++
(+)- <i>cis</i> -B[a]P-dG : del.	B	+/-
(-)- <i>cis</i> -B[a]P-dG : del.	nd	+/-
(+)- <i>cis</i> -B[a]P-dA : dT	B	nd
(+)- <i>trans</i> -B[a]P-dA : dT	B distorsion	+
(-)- <i>trans</i> -B[a]P-dA : dT	B'	+/-
(+)- <i>trans</i> -B[c]Ph-dG : dC	B'	nd
(-)- <i>trans</i> -B[c]Ph-dG : dC		
(+)- <i>trans</i> -B[c]Ph-dA : dT	B	-
(-)- <i>trans</i> -B[c]Ph-dA : dT		
Amines aromatiques		
dG-AAF : dC	B	+++
dGAF : dC	A:B (90:10 à 50:50)	+/-
dG-AF : del.	B	nd
dG-AF : double del.		
dG-PhIP : dC	A:B	nd
dG-IQ : dC	A:B	nd
dG-Apy : dC	B	+++
dG-AB	A	nd
Autres		
Adduit de cholestérol	B	+++
Mono-adduit de psoralène	courbure: 8° relaxation: 34°	+

1.2.2. Mécanisme du NER

Les protéines impliquées dans le NER commencent à être bien connues (Table 2). Les facteurs majeurs du NER ont été découverts grâce à l'étude des patients atteints du syndrome XP. Des expériences de fusion cellulaire ont été utilisées pour compléter les défauts de réparation des cellules de différents patients. Sept défauts distincts ont ainsi été mis en évidence et les gènes impliqués ont été appelés XP-A à XP-G. Il existe également un syndrome XP-V (variant) présentant un défaut de synthèse translésionnelle. Chaque produit de ces gènes présente une fonction unique et bien précise.

Deux modèles ont été confrontés pour expliquer le cheminement de cette voie de réparation : un modèle d'assemblage séquentiel des différents facteurs au site du dommage ou un complexe pré-assemblé sous forme de « repairosome » contenant les facteurs essentiels à la détection et à la réparation du dommage. C'est en fait un assemblage successif des différents facteurs qui prend place après détection de la lésion et activation de la machinerie moléculaire de réparation (Guzder et al, 1996 ; Volker et al, 2001). Des études de microscopie *in vivo* ont permis de valider définitivement ce modèle. Les protéines du NER ont été fusionnées à une protéine fluorescente, la GFP (« Green Fluorescent Protein »), et leur mobilité a été mesurée par FRAP (« Fluorescence Recovery After Photobleaching »), avant et après irradiation dans des cellules normales ou déficientes pour certains facteurs du NER. Les protéines sont mobiles avant l'irradiation, elles ont un coefficient de diffusion élevé et caractéristique pour chaque protéine, confortant l'hypothèse de l'existence de protéines libres dans la cellule. Puis elles sont transitoirement immobilisées après irradiation des cellules, indiquant leur implication dans les processus de réparation. Par exemple pour XPA, il a été montré que 30% de la protéine était immobilisée environ 5 minutes après irradiation, ce phénomène étant dépendant de la présence de la protéine XPC (Rademakers et al, 2003).

Le NER est une voie de réparation très complexe qui implique de nombreuses protéines ayant parfois d'autres rôles dans le métabolisme cellulaire. Le modèle présenté ici est le modèle le plus récent et généralement le mieux admis (Figure 4 ; pour revue, Gillet et Schärer, 2006 ; Foustéri et Mullenders, 2008 ; Shuck et al, 2008 ; Sugasawa, 2008).

Table 2. Principales protéines impliquées dans le NER. Dans ce tableau sont regroupées les protéines intervenant dans le NER avec mention de leur taille (en kDa) et de leur fonction connue ou supposée. Les partenaires connus sont indiqués dans la dernière colonne (D'après Gillet and Schärer, 2006).

Facteur	Gènes	Protéines	Taille (kDa)	Fonction	Partenaires
XPC/Rad23B/ Centrine 2	<i>Rad23B</i> <i>XPC</i> <i>HsCen2</i>	Rad23B XPC Centrine 2	58 125 19	Reconnaissance des lésions	TFIIH XPA UV-DDB
UV-DDB	<i>DDB1 (p127)</i> <i>DDB2 (p48)</i>	DDB1 DDB2	127 48	Reconnaissance des CPD ? Remodelage de la chromatine ?	XPC RPA
XPA/RPA	<i>XPA</i> <i>RPA1</i> <i>RPA2</i> <i>RPA3</i>	XPA RPA70 RPA32 RPA14	31 68 30 14	Rôle architectural ? Vérification de la présence d'une lésion ? Protection de l'ADN simple brin	XPC RPA TFIIH ERCC1 XPA XPG PCNA/RCF
TFIIH	<i>XPB (ERCC3)</i> <i>XPB (ERCC2)</i> <i>GTF2H1</i> <i>(TFB1)</i> <i>GTF2H2</i> <i>GTF2H3</i> <i>(TFB4)</i> <i>GTF2H4</i> <i>(TFB2)</i> <i>GTF2H5</i> <i>(TTDA)</i> <i>MNAT1 (TFB3)</i> <i>CDK7</i> <i>CCNH</i>	XPB XPB p62 p44 p34 p52 p8 Mat1 Cdk7 Cycline H	89 87 62 44 34 52 9 36 39 38	hélicase 3' → 5' hélicase 5' → 3' Liaison à l'ADN ? Liaison à l'ADN ? Stabilisation TFIIH CAK : phosphoryle l'ARN pol II et d'autres substrats	XPC XPA XPG XPF
XPF/ERCC1	<i>XPF (ERCC4)</i> <i>ERCC1</i>	XPF ERCC1	103 33	endonucléase 5'	XPA TFIIH
XPG	<i>XPG</i>	XPG	133	endonucléase 3'	RPA TFIIH PCNA ?
PCNA/RFC	<i>RFC1</i> <i>RFC2</i> <i>RFC3</i> <i>RFC4</i> <i>RFC5</i> <i>PCNA</i>	RFC1 RFC2 RFC3 RFC4 RFC5 PCNA (trimère)	128 39 41 40 38 3x29	facteur de processivité de PCNA anneau de processivité	RPA pol δ XPG ?
pol δ	<i>p125</i> <i>p66</i> <i>p50</i> <i>p12</i>	p125 p66 p50 p12	124 51 51 12	ADN polymérase	PCNA
pol ε	<i>p261</i> <i>p59</i> <i>p17</i> <i>p12</i>	p261 p59 p17 p12	261 59 17 12	ADN polymérase	PCNA
ligase I	<i>LIG1</i>	ligase I	102	ligature des discontinuités	PCNA

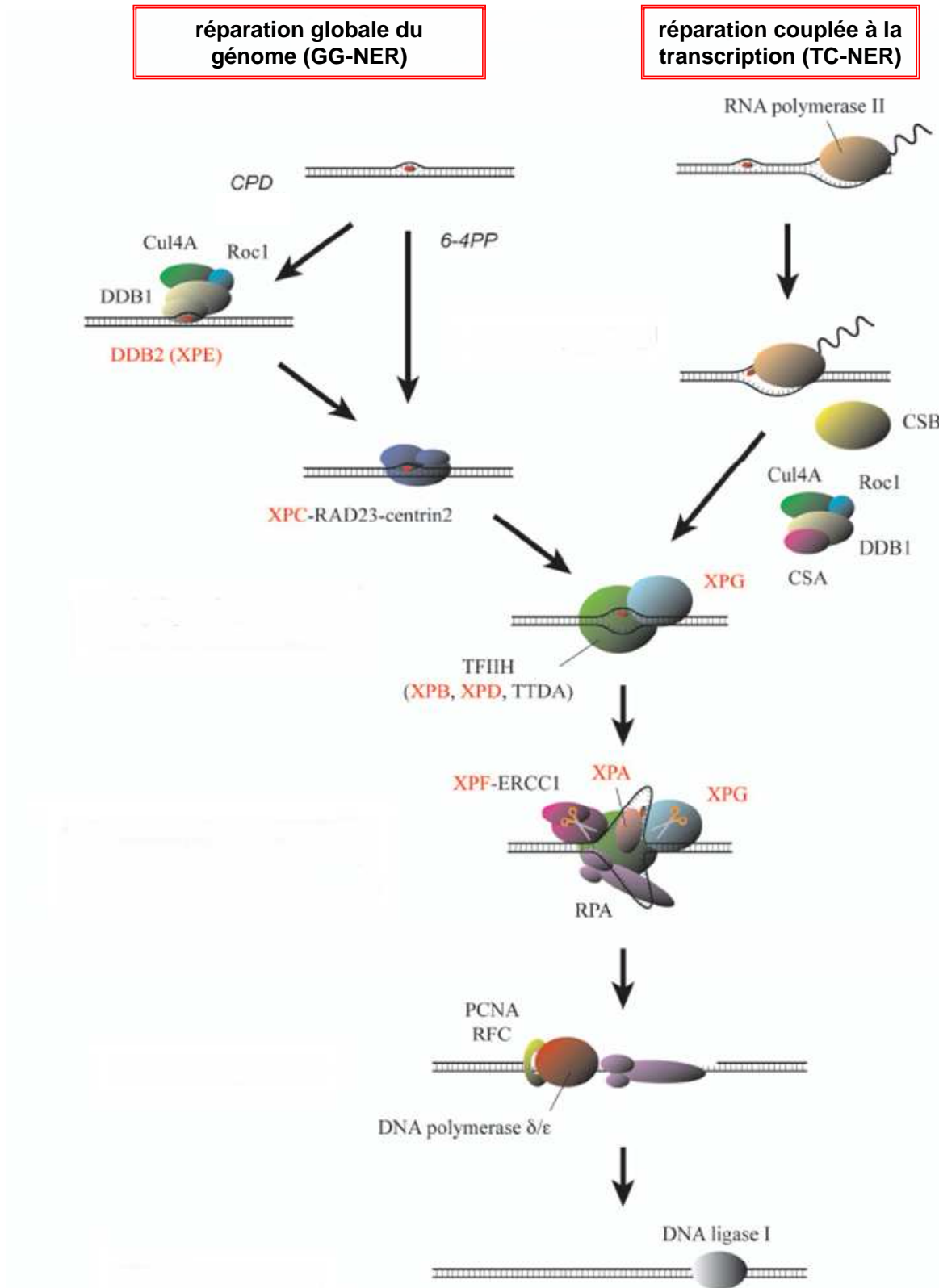


Figure 4. Mécanisme du NER. Les lésions de l'ADN sont détectées directement par XPC/Rad23B/centrine 2 ou avec l'aide de DDB2 (GG-NER), ou après blocage de l'ARN PolIII (TC-NER). Il y a d'abord une ouverture locale de l'ADN par les hélicases XPB et XPD, puis le complexe de pré-incision se forme autour de la lésion comprenant XPA/RPA et XPG. Après incision du brin endommagé par XPF et XPG, l'ADN intact est synthétisé par les polymérase δ/ε puis reliqué par l'ADN ligase I. (D'après Sugawara, 2008)

1.2.2.1. Initiation du TC-NER

Lors de la première étape du NER, la réparation peut être déclenchée lorsque la RNAPolIII est bloquée au niveau des sites de dommages de l'ADN sur le brin des gènes en cours de transcription (Figure 4). Ces lésions doivent être réparées rapidement pour permettre la reprise de la transcription. Cette sous-voie est la réparation couplée à la transcription (TC-NER). L'ADN endommagé est alors pris en charge par deux protéines, CSA et CSB (« Cockayne Syndrome A et B » ; Fousteri et Mullenders, 2008). Ces protéines peuvent être responsables du syndrome de Cockayne. La protéine CSA fait partie d'un complexe E3-ubiquitine-ligase constitué des protéines DDB1, Culine 4A et ROC1/Rbx1 (Groisman et al, 2003). Le gène CS-B code pour une protéine de la famille SWI/SNF impliquée dans le remodelage ATP-dépendant de la chromatine. Elle possède une activité ATPasique dépendante de l'ADN, et pourrait être un lien entre la réparation, la transcription et la structure de la chromatine. En présence d'un complexe de transcription bloqué, la protéine CSB peut stimuler la transcription en ajoutant un nucléotide au transcrit naissant, mais n'induit pas le bypass de la lésion. Après une irradiation aux UV, elle joue un rôle dans la transcription de nombreux gènes (Proietti-de-santis et al, 2006). Seule CSB est nécessaire au recrutement des facteurs du NER. Toutefois, la coopération des deux facteurs va permettre le recrutement des protéines XAB2 (impliquée dans la transcription et l'épissage), HMNG1 (protéine de liaison aux nucléosomes) et du facteur TFIIS qui pourrait être impliqué dans la reprise de la transcription (Fousteri et al, 2006).

1.2.2.2. Initiation du GG-NER

Les lésions éliminées par le NER peuvent également être reconnues et réparées sur l'ensemble du génome (GG-NER). C'est une voie importante car elle réduit les probabilités de blocage et contournement de la fourche de réplication. Plusieurs facteurs dont XPA et XPC présentent une forte affinité pour l'ADN endommagé et semblent pouvoir jouer le rôle de senseur de lésion. Des études ont d'abord montré que XPA-RPA était l'initiateur du NER (Wakasugi et Sancar, 1999). Mais *in vivo*, dans des cellules de patients XP-A, la protéine XPC colocalise aux dommages induits par les UV, alors que dans des cellules de patients XP-C la protéine XPA n'est pas recrutée (Volker et al, 2001). De plus, les cellules XP-C sont uniquement déficientes pour le GG-NER, alors que les cellules XP-A sont déficientes pour les

deux sous-voies du NER. La protéine XPC est donc la protéine initiatrice du GG-NER, et c'est une des seules protéines spécifiques à cette voie.

La protéine XPC a une taille de 125 kDa, elle existe sous la forme d'un hétérotrimère avec les protéines Rad23B et la centrine 2 (Masutani et al., 1994 ; Araki et al., 2001). La protéine Rad23B seule n'a pas d'affinité pour l'ADN. Cependant, elle stimule la liaison de XPC à l'ADN endommagé, et l'efficacité du NER *in vitro* (Sugasawa et al, 1996). Le complexe XPC/Rad23B reconnaît les photoproduits, des crosslinks intra-brin ADN-cis-platine, les mono-adduits de psoralène mais également des crosslinks inter-brin en coopération avec XPA (Thoma et al, 2005). La présence de Rad23B serait également nécessaire pour induire le déplacement de XPC de la lésion par XPA-RPA (You et al, 2003). La centrine 2 est une protéine centrosomale impliquée dans la division cellulaire. Son rôle exact dans le NER n'est pas déterminé, mais elle peut stimuler le NER *in vitro* en coopération avec Rad23B (Araki et al, 2001). De plus, l'inhibition de l'interaction entre XPC et la centrine 2 réduit légèrement l'efficacité de réparation des 6,4-PP (Nishi et al, 2005).

Pour accomplir son rôle dans la reconnaissance des lésions et le déclenchement du NER, la protéine XPC doit interagir avec plusieurs partenaires. Ses domaines d'interaction avec l'ADN et différents facteurs protéiques sont tous situés dans sa partie C-terminale (Li et al, 1997 ; Uchida et al, 2002 ; Popescu et al, 2003 ; Figure 5).

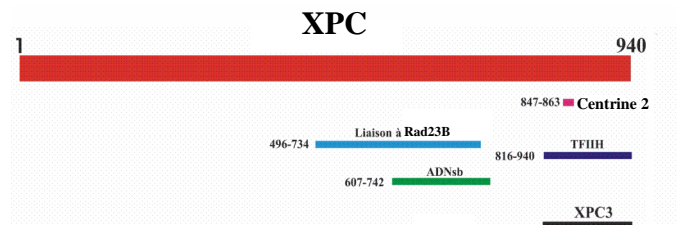


Figure 5. Domaines d'interaction connus entre XPC et l'ADN ou ses partenaires protéiques. Ils sont situés dans la moitié C-terminale de XPC. Les domaines de liaison à Rad23B et l'ADN se chevauchent, ainsi que les domaines d'interaction avec la centrine 2 et TFIIH. XPC3 : peptide utilisé pour l'obtention d'anticorps anti-XPC (d'après G.Craescu).

Le complexe XPC/Rad23B présente une certaine affinité pour l'ADN sain, et celle-ci augmente d'un facteur 400 quand l'ADN est endommagé (Batty et al, 2000). Mais cette affinité est plus faible pour les CPD que pour les 6,4-PP (Sugasawa et al, 2001) Ainsi, pour la réparation des CPD, le dimère XPC/Rad23B est secondé par un complexe de liaison à l'ADN endommagé (DDB, « DNA Damage Binding ») également appelé XPE (Wittschieben et al,

2005). Le facteur XPE est composé des protéines DDB1 (p127) et DDB2 (p48). Il participe à la détection de certaines lésions et coordonne la régulation de l'initiation du NER en modulant l'activité transcriptionnelle et la dégradation de XPC, et en modulant l'accessibilité aux facteurs du NER dans un contexte chromatinien.

Comment XPC peut-il reconnaître les lésions prises en charge par le NER, qui sont de nature et de structure variées ? Ce facteur protéique a une forte affinité pour l'ADN courbe, avec une préférence pour les structures nucléotidiques contenant des jonctions entre des régions simple-brin et double-brin. Il existe un modèle biparti de discrimination de substrat : l'altération chimique d'un résidu associée à une perte d'appariement de bases seraient nécessaires à l'initiation du GG-NER (Hess et al, 1997). En effet, la distorsion de l'hélice d'ADN est déterminante pour la fixation de XPC, mais elle doit être associée à la présence d'une base endommagée pour déclencher la réparation (Sugasawa et al, 2001). Le complexe reconnaît en fait la configuration simple-brin opposée à la lésion, ce qui expliquerait la très grande variété de lésions réparées par le GG-NER (Maillard et al, 2007). Une fois fixée sur la lésion, XPC initie l'ouverture locale de l'ADN (Tapias et al, 2004).

1.2.2.3. Vérification de la lésion et ouverture de l'ADN

Après la reconnaissance des lésions, le duplexe d'ADN est relaxé par le facteur de transcription TFIIH. Ce complexe multifonctionnel est composé de 10 sous-unités dont les produits des gènes XP-B et XP-D, qui contiennent des domaines à activité hélicase dépendante de l'ATP. Lors du TC-NER, le facteur TFIIH interagit avec la RNAPolIII (Maldonado, 1996), CSA (Henning et al, 1995) et CSB (Iyer et al, 1996). Lors du GG-NER, il est recruté par interaction directe avec XPC, par XPB ou p62 (Volker et al, 2001 ; Yokoi, 2000).

Les deux hélicases sont indispensables au NER. La protéine XPB possède une activité hélicase de 3' à 5', la protéine XPD a une activité inverse. Ces hélicases seraient également impliquées dans un processus de vérification de la lésion : elles scannerait individuellement les brins d'ADN pour faciliter la discrimination entre le brin endommagé et le brin intact (Dip et al, 2004). Cette étape de vérification permettrait le désengagement rapide du complexe XPC si la présence d'une lésion n'est pas confirmée.

1.2.2.4. Formation du complexe de pré-incision

Après ouverture de l'ADN par TFIIH, les trois facteurs XPA, RPA et XPG sont recrutés pour former un ensemble appelé « complexe de pré-incision », où l'ADN a une conformation ouverte.

Le gène XP-G code pour une endonucléase. Sa présence est requise structurellement pour former le complexe de pré-incision, indépendamment de son activité catalytique qui intervient plus tardivement (Wakasugi et al, 1997). Son activité catalytique dépendrait d'ailleurs de sa conformation adoptée dans le complexe de pré-incision (Hohl et al, 2003). Le facteur XPG est recruté grâce à ses interactions avec TFIIH.

La protéine XPA possède un domaine en doigt de zinc et présente une forte affinité pour l'ADN endommagé (Asahina, 1994). Ce domaine est aussi impliqué dans des interactions protéine-protéine avec RPA (Li et al, 1995). RPA est une protéine très conservée, qui existe sous la forme d'un complexe hétérotrimérique qui se lie et stabilise l'ADN simple-brin. Elle a un rôle essentiel lors de la réplication et de la recombinaison (Binz et al, 2004). RPA a une certaine affinité pour l'ADN endommagé qui augmente quand elle interagit avec XPA (Wakasugi et Sancar, 1999). XPA lie les duplexes courbes rigides et RPA se fixe sur l'ADN simple-brin. L'association de ces protéines constituerait un facteur de régulation contrôlant la déformation de l'ADN et la présence de la lésion, ainsi que la conformation du complexe de pré-incision (Missura et al, 2001). XPA interagit avec de nombreuses protéines du NER (RPA, ERCC1-XPF, TFIIH, XPC, Table 2). Les rôles de XPA ne sont sans doute pas tous connus, mais cette protéine semble avoir un rôle clé dans le contrôle de l'assemblage précis du complexe de pré-incision (Gillet et Schärer, 2006). L'étape suivante est l'incision de la séquence nucléotidique endommagée.

1.2.2.5. Incision du brin endommagé

L'endonucléase ERCC1-XPF est le dernier facteur recruté dans le complexe formé autour de la lésion. Cet hétérodimère est instable en absence d'une des deux sous-unités. RPA, fixé sur l'ADN simple-brin, va faciliter le positionnement et la stimulation des activités endonucléasiques des protéines ERCC1-XPF et XPG (de Laat et al, 1998).

Les endonucléases ERCC1-XPF et XPG sont structure-spécifiques, elles coupent l'ADN aux jonctions entre une région simple-brin et une région double-brin. ERCC1-XPF coupe l'ADN en 5' et XPG en 3'. La position des deux incisions peut varier en fonction du type de lésion. L'oligonucléotide excisé a une taille allant de 24 à 32 nucléotides. Les deux

endonucléases peuvent faire des incisions sur les deux brins du substrat. La discrimination du brin endommagé et l'assemblage correct du complexe de pré-incision, par TFIIH et XPA-RPA, sont donc primordiaux afin d'éviter le clivage du brin intact (Sugasawa, 2008).

1.2.2.6. Synthèse réparatrice

La présence d'ERCC1-XPF n'induit pas de changement conformationnel majeur, mais son activité catalytique provoque le passage de l'étape d'excision à l'étape de resynthèse de l'ADN : l'incision en 5' libère un groupement hydroxyle à l'extrémité 3' de l'ADN qui permet d'initier la synthèse nucléotidique. La brèche simple-brin induite par l'excision de l'oligonucléotide est comblée par les polymérase δ/ϵ , les facteurs RFC (« Replication Factor C »), PCNA (« Proliferating Cell Nuclear Antigen ») et la ligase I. Ces facteurs sont d'ailleurs suffisants pour procéder à la resynthèse *in vitro* (Shivji et al, 1995). RFC catalyse le chargement ATP-dépendant de l'anneau de processivité PCNA qui s'assurera de la progression fidèle de la polymérase. RPA est le seul facteur du complexe d'incision qui est toujours présent à cette étape. Il protège le brin non endommagé et pourrait recruter PCNA et RFC (Riedl et al, 2003). L'étape finale du NER est la ligation de l'ADN néosynthétisé au brin d'origine par la ligase I.

1.2.2.7. Reprise de la transcription après le TC-NER

La mise en place du TC-NER semble avoir lieu en présence de la RNAPolIII (Fousteri et Mullenders, 2008). Des changements conformationnels sont tout de même nécessaires pour faciliter l'accessibilité des protéines de réparation, ces modifications étant dépendantes de la protéine CSB. La RNAPolIII ferait marche arrière le long de l'ARN pour permettre la réparation. Puis la reprise de la transcription aurait lieu après repositionnement du centre actif de la RNAPolIII à l'extrémité 3' de l'ARNm et grâce à l'interaction de la RNAPolIII avec TFIIS. Cette interaction est dépendante de CSA et CSB.

1.2.2.8. La synthèse translésionnelle (TLS)

Les fibroblastes de patients XP-V ont un taux de NER normal, mais ils présentent des défauts de réplication après une irradiation aux UV (Lehmann et al, 1975). Le gène XP-V code pour une polymérase η qui peut synthétiser l'ADN fidèlement à travers la lésion du brin modèle, permettant de contourner la lésion. Elle fait partie de la famille des polymérase qui

peuvent avoir une activité de synthèse appelée translésionnelle (TLS, « TranLesion Synthesis ») (pour revue, Lehmann et al, 2007).

La réparation des CPD lors du GG-NER est assez lente, il y a donc une forte probabilité de rencontre entre une fourche de réplication et la lésion. La polymérase « classique » est alors remplacée par une polymérase TLS, dont le contournement et la fidélité varie en fonction de l'enzyme et du type de lésion. La polymérase η peut synthétiser l'ADN fidèlement à travers des CPD, mais le contournement des 6,4-PP est plus délicat (Masutani et al, 2000). Les autres polymérases TLS sont incapables de franchir les CPD, ou seront majoritairement fautive, comme la polymérase ι (Tissier et al, 2000).

1.3. Régulation du NER

Lors du TC-NER, le blocage de la RNAPolIII sert directement de signal pour la mise en place de la réparation. Différents types de régulation permettent de contrôler l'initiation du GG-NER, essentiellement par les protéines DDB2 et p53. La cible majeure est XPC, dont le niveau basal et après la reconnaissance des lésions sont finement régulés. La protéine DDB2 a un rôle crucial ; elle n'est pas impliquée directement dans la réparation de l'ADN endommagé mais elle intervient dans la régulation transcriptionnelle et les modifications post-traductionnelles de XPC, ainsi que dans le remodelage de la chromatine.

1.3.1. Régulation transcriptionnelle

La réponse cellulaire aux agents génotoxiques implique l'activation de points de contrôle qui induisent l'arrêt du cycle cellulaire. Ceci permet soit de reporter la réplication de l'ADN ou la division cellulaire, soit de déclencher de l'apoptose si les dommages persistent. La protéine p53 régule un grand nombre de ces processus principalement en tant que facteur de transcription.

Lors du NER, l'activité de p53 est nécessaire à la réparation des CPD uniquement lors du GG-NER (pour revue : Ford, 2005). Des fibroblastes dérivés de tumeurs de patients atteints du syndrome de Li-Fraumeni, homozygotes pour des mutations du gène p53, sont incapables de réparer les CPD, contrairement aux mutants hétérozygotes et aux cellules

normales (Ford et Hanawalt, 1995 ; Hanawalt, 2002). p53 contrôle la transcription des gènes XPC et DDB2, aussi bien au niveau basal que celui induit par les UV, et d'une manière temps et dose-dépendante (Hwang et al, 1999 ; Adimoolam et Ford, 2002 ; Chen et al, 2002).

De plus, bien que p53 ne colocalise pas sur l'ADN endommagé (Fitch et al, 2003), le recrutement de XPC et du facteur TFIIH sont dépendants de la présence de p53 (Wang et al, 2003 ; Wang et al, 2004b).

1.3.2. Modifications post-traductionnelles

Les détecteurs de dommage et les protéines de réparation doivent agir rapidement. La régulation de ces protéines implique généralement des modifications post-traductionnelles, comme l'ubiquitylation et la phosphorylation (Huen et Chen, 2008). L'ubiquitine est connue pour son rôle d'adressage des protéines vers la voie de dégradation protéosomale, mais elle peut également stabiliser certaines protéines ou induire des voies de signalisation.

L'initiation du TC-NER et du GG-NER sont régulées par la polyubiquitylation de la RNAPolIII et de XPC, respectivement (Huang et D'Andrea, 2006). Les UV activent la polyubiquitylation de la RNAPolIII par CSA et CSB (Bregman et al, 1996). La polymérase ainsi modifiée pourrait éviter sa dégradation et permettre la reprise de la transcription. Chez la levure, l'interaction entre Rad26, l'orthologue de CSB, et Def1 a permis de suggérer un modèle où la lésion doit être rapidement réparée par le TC-NER, sinon la RNAPolIII serait dégradée via Def1 et laisserait la place au GG-NER (Woudstra et al, 2002).

La régulation de l'initiation du GG-NER par des modifications post-traductionnelles est effectuée par les protéines Rad23 et DDB. Chez la souris, l'interaction entre les protéines Rad23 et XPC protègent cette dernière de la dégradation protéosomale et permet de maintenir XPC à un niveau suffisant pour l'activation du NER (Ng et al, 2003). XPC serait également protégée grâce à la sumoylation (Wang et al, 2005).

Après une irradiation aux UV, le complexe DDB stimule la liaison de XPC sur la lésion et induit la polyubiquitylation de XPC et DDB2 (Figure 6). Le complexe DDB est composé des protéines DDB1 et DDB2, et de la culine 4A, roc1 et la ligase E3 qui sont des composants de la ligase de l'ubiquitine. L'ubiquitylation de XPC entraîne sa stabilisation,

certainement renforcée par son association avec Rad23B. La protéine DDB2 ubiquitinée est dégradée et induit un désassemblage du complexe DDB de la lésion (Sugasawa et al, 2005). La voie de l'ubiquitine serait donc un facteur modulant positivement le NER, en facilitant le recrutement des facteurs d'initiation aux sites de dommages.

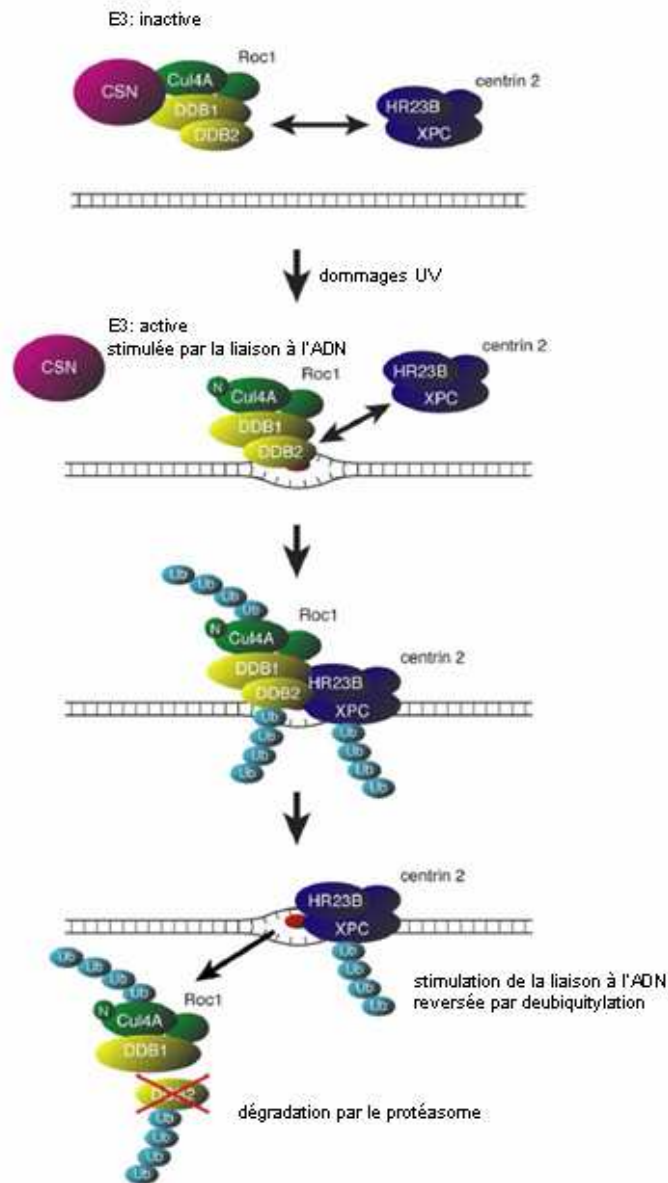


Figure 6. L'ubiquitylation de XPC est dépendante du complexe DDB. Dans des cellules non irradiées, le complexe DDB est inactivé par son interaction avec le signalosome COP9 (CSN). Après irradiation aux UV, DDB se fixe à l'ADN endommagé et se dissocie de CSN par neddylation de la culine 4A (indiquée par un « N »), entraînant l'activation d'E3. Le complexe recrute XPC par interactions protéiques, et ubiquitine DDB2 et XPC. L'affinité de XPC pour la lésion augmente alors que DDB2 est dégradée et induit la dissociation de DDB au niveau du site du dommage. L'affinité de XPC pour la lésion est reversée par deubiquitylation. (D'après Sugasawa et al, 2005)

XPC est dégradée directement par le protéasome 26S immédiatement après une irradiation aux UV. Cette dégradation est nécessaire au recrutement de XPG. Elle est induite par le complexe DDB, alors qu'il peut polyubiquityler et protéger XPC (Wang et al, 2007). Cette protection permettrait en fait l'initiation du GG-NER, puis sa dégradation faciliterait l'attachement des autres facteurs du NER comme XPG. Parallèlement aux activités de protection/dégradation de XPC, son activation transcriptionnelle par p53 assure son renouvellement. Cette régulation très fine montre le rôle unique mais complexe de XPC dans la détection des dommages et la mise en place du GG-NER.

La phosphorylation joue également un rôle dans la régulation du NER. Les protéines XPA et RPA sont phosphorylées suite à une irradiation aux UV (Shuck et al, 2008). La phosphorylation de XPA est nécessaire pour la survie cellulaire, mais son implication exacte dans le NER reste à déterminer. De plus, γ -H2AX est phosphorylé suite à une irradiation aux UV, en fonction de la présence de XPA ou XPC et en absence de cassures double-brin (Marti et al, 2006).

1.3.3. Remodelage de la chromatine

L'assemblage de l'ADN au sein de la chromatine affecte directement l'initiation du NER et l'efficacité de réparation. Un réarrangement de la structure de la chromatine est nécessaire en amont pour faciliter l'accessibilité des lésions aux différents facteurs de réparation. Il en résulte un modèle de « dépliement-repliement » de la chromatine, où les protéines de réparation auraient accès à un ADN décondensé (Gillet et Schäfer, 2006). La longueur minimale requise pour procéder au NER est d'environ 100 pb, et l'ADN enroulé autour d'un nucléosome mesure 147 pb. La disruption d'un seul nucléosome serait donc suffisante pour rendre accessible la lésion aux facteurs du NER (Figure 7).

Deux mécanismes peuvent induire une modification de structure de la chromatine : les modifications d'histones et le remodelage de la chromatine dépendant de l'ATP. Après une irradiation aux UV, le complexe DDB induit l'acétylation des histones H2A (Kapetanaki et al, 2006), H3 et H4 avant la mise en place du NER (Wang et al, 2006). Ce complexe est recruté en amont de XPC, et permet d'améliorer la fixation de XPC aux CPD. Un des rôles de DDB pourrait être de reconnaître les lésions dans un contexte chromatinien, puis d'induire des

modifications conformationnelles dans l'ADN permettant la mise en place du NER par l'intermédiaire de XPC (Luijsterburg et al, 2007).

Lors du NER, l'ADN est également relaxé grâce à des complexes de remodelage de la chromatine ATP-dépendants de la famille SWI2/SNF qui modifient la conformation des nucléosomes. Par exemple, le produit du gène CSB est une ATPase ADN-dépendante qui peut remodeler la chromatine. Chez la levure, une interaction entre *snf5/snf6* et *rad4/rad23* (XPC/rad23 chez l'homme) a été mise en évidence (Gong et al, 2006). Dans ce cas, ce sont les protéines de détection des dommages qui induisent l'activité de ces protéines de la famille SWI2/SNF afin de permettre la mise en place de la machinerie de réparation.

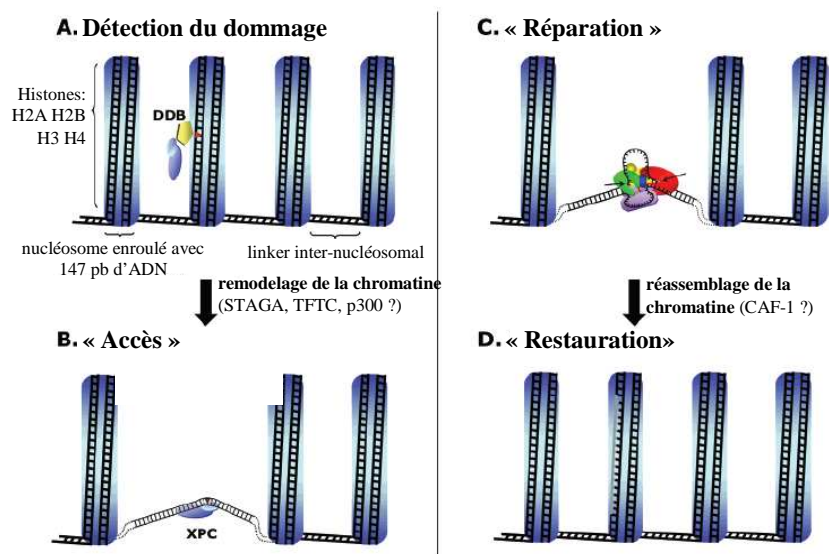


Figure 7. Modèle « Accès-Réparation-Restauration » du NER dans un contexte chromatinien. La lésion est détectée par l'action combinée de XPC et DDB (A), DDB recrute et active les facteurs nécessaires au remodelage de la chromatine qui induit le désassemblage d'un nucléosome et permet l'accès à la lésion (B) des autres facteurs du NER qui peuvent ensuite la réparer (C). La structure du nucléosome est ensuite restaurée (D). (D'après Gillet et Schäfer, 2006)

1.4. Maladies associées à un défaut du NER

Sur les 40 gènes dont les produits sont impliqués dans le NER, douze sont responsables de maladies génétiques (pour revue : Kraemer et al, 2007 ; Cleaver, 2005 ; Lehmann, 2003 ; de Boer et Hoeijmakers, 2000). Xeroderma pigmentosum (XP), le syndrome de Cockayne (CS) et la trichothiodystrophie (TTD) sont trois maladies génétiques rares,

autosomales récessives, aux caractéristiques cliniques différentes mais qui sont toutes associées à un défaut de gènes du NER.

1.4.1. Xeroderma Pigmentosum (XP)

1.4.1.1. Signes cliniques

Des expériences de fusion cellulaire ont permis l'identification de sept groupes de complémentation chez les patients XP (XP-A à XP-G). Il existe également un groupe XP-variant dû à des mutations du gène XP-V rendant la polymérase translésionnelle η inactive. Ces patients ont un défaut de réparation post-répllicative mais leur taux de GG-NER et de TC-NER sont normaux.

Le terme *xeroderma* signifie « peau parcheminée », et *pigmentosum* rappelle les perturbations pigmentaires de ces patients. Leurs traits caractéristiques sont la photosensibilité accrue des zones exposées au soleil, la peau et les yeux. Suite à une exposition au soleil, les patients XP développent une pigmentation ressemblant à des tâches de rousseur. L'apparition de cette pigmentation anormale chez les enfants en dessous de l'âge de deux ans est un marqueur clinique de la maladie. La peau des enfants atteints du syndrome XP peut développer des lésions précancéreuses comme des kératoses actiniques. Les yeux présentent également de graves atteintes comme des kératites et des conjonctivites chroniques induites par les UV. L'incidence de cette maladie varie de 1/250 000 dans les pays occidentaux à 1/40 000 au Japon et en Afrique du Nord. Les variants pathogènes des gènes XP-A, XP-C, XP-D et XP-V représentent 91% des cas XP dans le monde.

Les patients XP ont un risque de développement de cancers de la peau et des yeux qui est multiplié par mille. L'apparition de cancer de la peau intervient en moyenne à l'âge de dix ans, soit cinquante ans avant la population normale. Ils développent principalement des carcinomes à cellules basales ou squameuses, et moins fréquemment des mélanomes. Un diagnostic précoce et une protection du soleil rigoureuse pourra prévenir des plus sérieux cancers de la peau des patients XP. Ces patients présentent également un risque dix à vingt fois supérieur de développer des cancers internes avant vingt ans et la plupart meurent par néoplasie.

Environ 30% des patients XP développent des anomalies neurologiques. Les premiers signes cliniques sont une absence ou une diminution des réflexes tendineux et une

surdité progressive. Les enfants ont ensuite des difficultés à marcher et leur développement intellectuel décroît. La cause sous-jacente de ces affections semble être la dégénérescence neuronale primaire, certainement causée par l'accumulation de lésions endogènes (oxydatives) non réparées qui entraînent la mort des neurones.

1.4.1.2. Hétérogénéité génétique

Le syndrome XP est caractérisé par une hétérogénéité génétique. Par conséquence, en fonction du gène affecté et en fonction de la mutation au sein d'un même gène, il existe une hétérogénéité dans la sévérité du défaut de réparation, la fréquence d'apparition de cancer et la présence d'affections neurologiques.

La protéine XPC jouant un rôle uniquement pendant le GG-NER, les cellules de patients XP-C ont un niveau résiduel de réparation compris entre 15 et 30% dérivé du TC-NER. Les patients XP-C ne présentent pas d'anormalité neurologique. Le TC-NER est sans doute suffisant pour réparer les lésions induites dans les cellules neuronales.

Les patients XP-E présentent des mutations au niveau du gène DDB2 (Rapic-Otrin et al, 2003). La protéine XPE est impliquée exclusivement dans la réparation des CPD lors du GG-NER, les cellules de ces patients réparent donc normalement les 6,4-PP lors du GG-NER et ont une activité de TC-NER normale. Les patients XP-E n'ont aucune atteinte neurologique et présentent une photosensibilité modérée.

La protéine XPA intervient dans les deux sous-voies du NER. Le défaut de cette protéine chez les patients XP-A abolit complètement le NER, et induit un risque de cancer de la peau élevé ainsi que d'importants désordres neurologiques. Il existe des cas de mutations au niveau d'un site d'épissage permettant la production d'un faible taux de protéine normale, où les patients ont un phénotype moins sévère (States et al, 1998).

Les hélicases XPB et XPD sont des composantes du facteur de transcription TFIIH, impliqué dans le NER et dans la transcription. L'activité hélicase de XPB est essentielle pour l'initiation de la transcription ; seulement trois patients XP-B sont connus. En fonction de la mutation présente dans les gènes XP-B et XP-D, les activités hélicase ou transcriptionnelle sont différenciellement affectées et les conséquences phénotypiques sont variables.

Il existe peu de patients XP-F, qui sont modérément atteints. Une activité résiduelle de l'endonucléase ERCC1-XPF est détectable, la perte totale de cette fonction ne serait pas viable. Les mutations du gène XP-G sont rares mais leurs conséquences sont sévères, avec généralement une combinaison de symptômes XP et CS.

1.4.1.3. Polymorphismes et risque de cancer : l'exemple de XPC

Le syndrome XP-C est le plus fréquent parmi tous ceux associés à un défaut du NER. 45 patients XP-C ont été étudiés et 34 variations génétiques ont été associées à la maladie (Rivera-Begeman, 2007). Le gène XP-C est situé sur le chromosome 3. Les variations pathogènes sont réparties entre les exons 2 à 14, et 31 résultent en une protéine tronquée. Il n'y a pas assez de cas étudiés pour déterminer quelle variation est la plus fréquente. En effet, seulement deux à trois patients ont la même variation. Des patients peuvent présenter deux variations pathogènes comme c'est le cas pour le patient XP1UTSW. L'utilisation anormale d'un site cryptique d'épissage crée un décalage du cadre de lecture et entraîne la production d'une protéine tronquée. La deuxième variation est une délétion dans l'exon 14, résultant également en une protéine tronquée.

En raison du rôle de XPC dans la réparation de l'ADN et des conséquences biologiques des variations de ce gène, un intérêt significatif s'est porté sur la recherche de polymorphismes afin d'identifier des rôles potentiels dans la prédisposition au cancer de la peau mais également à d'autres types de cancer comme la vessie et le poumon. Des polymorphismes distincts des variants pathogènes, appelés exceptions, ont ainsi été associés à une réduction de l'activité de réparation et une augmentation du risque du cancer de la peau (Khan et al, 2002). Dans le cas de la variation K939Q (Khan et al, 2000), un plasmide contenant un ADNc de XPC portant cette variation répare correctement l'ADN. C'est un polymorphisme commun (38%) du gène XP-C qui a été associé à une augmentation du risque de cancer de la vessie (Sanyal et al, 2004). Ceci suggère que cette variation pourrait altérer d'autres fonctions de la protéine XPC. Il existe également une corrélation entre une réduction de l'expression de XPC, la réparation de l'ADN, et la progression du cancer de la vessie en relation avec le statut de p53 (Chen et al, 2007). De plus, il a été observé que XPC pouvait être hyperméthylé et ainsi inactivé dans le cancer du poumon (Wu et al, 2007). Cette inactivation est liée à l'occurrence de mutation de p53 lors de la tumorigenèse.

1.4.2. Le syndrome de Cockayne (CS)

Les patients CS sont généralement normaux à la naissance, mais le développement postnatal du cerveau est affecté, à cause d'une dégénérescence neuronale progressive et de la

démyélinisation. Ils sont photosensibles mais ne présentent pas de pigmentation caractéristique et développent peu de cancers. Les affections neurologiques sont associées à un vieillissement accéléré, provoquant une mort précoce, en moyenne à 12,5 ans.

Des mutations dans les gènes CS-A et CS-B sont responsable du syndrome CS. Ces deux protéines interviennent dans le TC-NER mais également dans la transcription. Les cellules de ces patients présentent un niveau d'apoptose induite par les UV ou le cisplatine très élevé (McKey et al, 2001), et la réponse transcriptionnelle est défectueuse suite à un stress oxydatif (Kyng et al, 2003). L'absence de cancer peut s'expliquer par le fait que l'apoptose induite par l'accumulation de dommages pourra compenser la mutagénèse liée à un défaut du TC-NER mais pourra être responsable de la dégénérescence neuronale (Hanawalt, 2002).

Certaines mutations retrouvées chez les patients XP-B, XP-D et XP-G peuvent être responsable d'un syndrome combiné XP/CS. Ces patients ont des atteintes caractéristiques du syndrome XP au niveau de la peau et des yeux, et des atteintes neurologiques typiques du syndrome CS.

1.4.3. La Trichothiodystrophie (TTD)

Les patients TTD ont une caractéristique commune : une déficience en acides aminés soufrés qui rend leurs cheveux fragiles. La sévérité des autres symptômes est variable, allant de cette simple fragilité des cheveux à de graves anomalies neurologiques et de développement. Une démyélinisation a été observée chez les patients TTD, qui peuvent présenter des défauts de développement du squelette, et des défauts du système nerveux. Comme les patients CS, ces patients sont sensibles à la lumière solaire mais ne développent ni de défauts pigmentaires, ni de cancer de la peau.

Les patients TTD présentent des défauts au niveau des gènes XP-D, XP-B ou TTD-A. Les trois protéines font partie du facteur de transcription TFIIH. Par exemple, des mutations du gène XP-D retrouvées chez des patients TTD présentent un défaut dans l'activité hélicase du facteur TFIIH, ainsi qu'un défaut au niveau de son activité transcriptionnelle. Des mutations du gène XP-D de patients TTD ont pour conséquence la réduction de l'expression et de la synthèse de β -globine, conduisant à la β -thalassémie chez ces patients (Viprakasit et al, 2001).

1.5. Les protéines Rad23 dans l'initiation du GG-NER et la voie de l'ubiquitine

La famille Rad23 comporte entre autres la protéine rad23 de levure et les deux homologues de mammifères Rad23A et Rad23B. Elles participent au GG-NER en stabilisant rad4 (levure) ou son orthologue XPC (mammifère). Les protéines Rad23 interagissent avec le protéasome et avec des protéines conjuguées à l'ubiquitine, ce qui suggère un rôle dans la régulation de la dégradation des protéines. Chez l'homme (Figure 8), la protéine Rad23B possède un domaine N-terminal ressemblant à l'ubiquitine (ubiquitin-like domain, « Ubl ») et deux domaines associés à l'ubiquitine (ubiquitin-associated domain, « UBA »). Rad23B interagit avec XPC par un domaine situé dans sa partie C-terminale. Son domaine Ubl interagit avec le complexe 19S du protéasome 26S alors que les domaines UBA peuvent se lier aux chaînes polyubiquitinées.

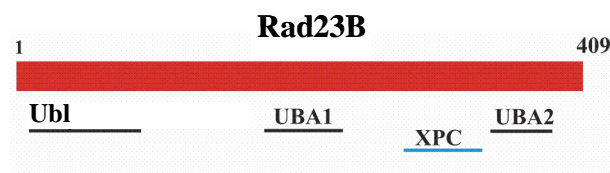


Figure 8 Les domaines caractéristiques de Rad23B humain. La protéine possède un domaine N-terminal ressemblant à l'ubiquitine (Ubl), un domaine central et un domaine C-terminal associés à l'ubiquitine (UBA1 et 2). Rad23B interagit avec XPC par sa partie C-terminale, entre les deux domaines UBA. D'après G.Craescu.

1.5.1. Rôles de la protéine rad23 chez la levure *S.cerevisiae*

Rad23 forme un complexe avec rad4 appelé NEF-2 (Nucleotide Excision Repair Factor 2). Ce complexe lie préférentiellement l'ADN endommagé et est nécessaire à son incision, mais ne possède pas d'activité catalytique (Guzder et al, 1998 ; Jansen et al, 1998). Ceci suggère que NEF-2 aurait un rôle dans une étape précoce du GG-NER, en reconnaissant les dommages.

Rad23 interagit avec rad4 et le protéasome par ses parties C-terminale et N-terminale, respectivement (Schauber et al, 1998). L'interaction entre rad4 et rad23 entraîne

l'ubiquitylation et la stabilisation de rad4, mais l'interaction entre rad23 et le protéasome est également requise pour le NER (Ortolan et al, 2004). Ces auteurs suggèrent qu'après la réparation de l'ADN certaines protéines doivent être dégradées, évoquant ainsi un nouveau mode de régulation d'une voie de réparation de l'ADN. En effet, rad4 est dégradée par le protéasome 26S, l'activité du NER augmentant chez des mutants défectueux pour l'activité protéasomale (Lommel et al, 2000 ; Lommel et al, 2002). Rad23 pourrait ainsi jouer deux rôles concurrents lors du NER. Toutefois, l'interaction entre rad23 et le protéasome n'apparaît pas reliée à la stabilité de rad4. Rad23 peut donc stimuler la liaison de rad4 sur l'ADN endommagé, et stabiliser le niveau de rad4 (Ramsey et al, 2004 ; Xie et al, 2004).

Le complexe NEF-2 interagit également avec Snf5 et 6, deux sous-unités du complexe de remodelage de la chromatine SWI/SNF (Gong et al, 2006). Cette interaction est stimulée par les UV. Le NER et le réarrangement des nucléosomes sont réduits quand le complexe SWI/SNF est inactivé. Ces résultats indiquent que le complexe SWI/SNF pourrait être recruté au niveau des lésions par le complexe rad4/rad23 afin d'augmenter l'accessibilité à la chromatine des autres facteurs du NER.

De nombreux régulateurs du cycle cellulaire sont dégradés par la voie de l'ubiquitine-protéasome (Reed, 2003). Des protéines contenant des domaines UBL-UBA telles que rad23 ou dsk2 sont ainsi essentielles à la progression du cycle cellulaire (Biggins et al, 1996 ; Diaz-Martinez et al, 2006). La protéine rad23, en plus de sa fonction lors de l'initiation du GG-NER, pourrait donc réguler d'autres voies métaboliques.

1.5.2. Rôles des protéines Rad23A&B chez les mammifères

Chez les mammifères, il existe deux homologues de rad23 appelés Rad23A et Rad23B. Un complexe XPC/Rad23B a été purifié à partir de cellules HeLa (Masutani et al, 1994). Rad23B n'est pas essentiel au GG-NER *in vitro* mais il peut le stimuler en présence de XPC (Sugasawa et al, 1996). Cette stimulation dépend d'ailleurs de la région de Rad23B impliquée dans l'interaction avec XPC (Masutani et al, 1997). Dans un système de réparation reconstitué à l'aide de protéines ou de complexes purifiés, Rad23B multiplie par 10 l'activité de liaison à l'ADN de XPC, et le complexe XPC/Rad23B a une affinité 400 fois plus élevée pour l'ADN endommagé (Batty et al, 2000). Il a été montré que XPC interagissait *in vivo* avec Rad23B, et des cellules déficientes en XPC transfectées avec une protéine délétée de son domaine d'interaction avec Rad23B ne peuvent pas être complétées (Li et al, 1997). Mais

Rad23B n'étant pas absolument requis pour le GG-NER, les auteurs évoquent la possibilité que la région de XPC délétée puisse être impliquée dans d'autres fonctions.

Rad23A peut également stimuler le GG-NER *in vitro* ce qui suggère que ces deux protéines sont fonctionnellement redondantes, au moins pour la réaction du GG-NER (Sugasawa et al, 1997). Ces résultats ont été confirmés *in vivo* chez la souris où les deux protéines sont appelées mRad23A et mRad23B. Mais chez l'homme, des études récentes montrent en fait que ces deux protéines auraient des rôles distincts aussi bien lors du GG-NER que dans la dégradation des protéines.

1.5.2.1. Les protéines mRad23A et mRad23B ont des fonctions redondantes ?

Des fibroblastes embryonnaires de souris (MEFs, « Mouse Embryonic Fibroblasts ») mRad23B^{-/-} sont peu sensibles aux UV et présentent un taux de réparation de l'ADN normal, ce qui indique que mRad23A a compensé la fonction de mRad23B dans le GG-NER (Ng et al, 2002). Mais les embryons mRad23B^{-/-} montrent de graves problèmes de développement et un taux élevé de mort intra-utérine, suggérant un rôle unique de mRad23B dans le développement. Deux études ont ensuite été réalisées sur des MEFs simples ou doubles Knock-Out (KO) (Ng et al, 2003 ; Okuda et al, 2004). Des MEFs mRad23A^{-/-} et mRad23B^{-/-} ont une activité de GG-NER normale alors que des MEFs double-KO mRad23A^{-/-}_mRad23B^{-/-} (appelés D^{KO}) ont une activité très réduite similaire à celle de MEFs XPC^{-/-}, confirmant un certain chevauchement fonctionnel des deux protéines lors du GG-NER. Elles protégeraient en fait XPC de la dégradation protéasomale : en absence des protéines mRad23, la protéine XPC est instable et faiblement détectable, empêchant l'initiation du GG-NER. L'expression de mRad23A dans des MEFs D^{KO} restaure d'ailleurs le niveau basal et la stabilité de XPC mais aussi l'activité de réparation de ces fibroblastes. Les auteurs suggèrent qu'une partie de mRad23B est complexée à XPC et contrôlerait sa protéolyse pour maintenir son niveau d'expression à un taux basal optimal (Figure 9). Après une irradiation, il y a une augmentation de l'expression de XPC qui est stabilisée par son interaction avec mRad23B. Les protéines mRad23 contrôleraient donc le niveau basal et induit de XPC.

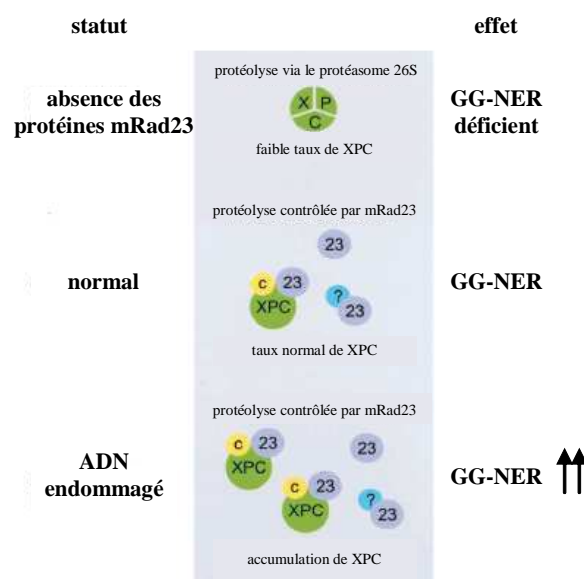


Figure 9. Modèle de régulation de XPC par mRad23. En absence des protéines mRad23, la protéine XPC est instable et dégradée via le protéasome 26S. Le niveau basal est diminué, et l'activité GG-NER réduite. En conditions normales, les protéines mRad23 stabilisent XPC et contrôlent sa dégradation. En présence de dommages, le taux de XPC augmente et la protéine s'accumule dans le noyau, stimulant le GG-NER. Le point d'interrogation représente d'autres facteurs qui pourraient être régulés par les protéines mRad23. (D'après Ng et al, 2003)

1.5.2.2. Les protéines Rad23A et Rad23B humaines ont des fonctions distinctes chez l'homme ?

Chez l'homme, 10% de Rad23B est complexée à XPC (van der Spek et al, 1996). Les protéines Rad23A et Rad23B migrent différemment dans un gel non-dénaturant, suggérant qu'elles n'adoptent pas la même conformation. Le complexe purifié XPC/Rad23B a été décrit comme ayant une taille d'environ 500-550 kDa. Dans des extraits cellulaires il a une taille plus importante, suggérant que XPC/Rad23B fait partie d'un plus gros complexe. La réduction des deux protéines par interférence ARN à court terme dans des cellules dérivées de cellules HeLa a permis de montrer que les deux protéines étaient requises pour le NER (Hsieh et al, 2005). En effet, des cellules Rad23B^{KD} et Rad23A+B^{KD} sont sensibles aux UVC et des cellules Rad23A^{KD} sont légèrement plus sensibles que des cellules contrôles. Ces cellules ont une activité de réparation de l'ADN réduite, montrant que Rad23A ou B sont incapables de compenser la réduction d'une des protéines. De plus, après la déplétion de Rad23A et suite à une irradiation aux UVC, l'expression du gène XP-C n'est plus induite, suggérant que Rad23A intervient dans le NER en régulant l'expression de XPC. Une expérience

d'immunoprécipitation a montré que Rad23A était majoritairement liée à p53. Rad23A pourrait ainsi réguler l'expression de XPC via son interaction avec p53.

Les interactions des deux protéines avec le protéasome et des protéines ubiquitinées ont été analysées (Chen et al, 2006). Le domaine Ubl de Rad23B mais pas celui de Rad23A peut lier le protéasome de levure. De plus, les domaines UBA et Ubl ainsi que les protéines entières forment des interactions distinguables avec le protéasome humain et des protéines ubiquitinées. Ces approches *in vitro* montrent ainsi que les deux protéines Rad23 humaines auraient des fonctions spécifiques, indépendamment de leur rôle dans la réparation de l'ADN. Elles sont donc multifonctionnelles.

1.5.2.3. Un rôle dans la régulation de p53 ?

Les protéines Rad23, en association avec mdm2, seraient impliquées dans la régulation du turn-over de p53 (Glockzin et al, 2003 ; Brignone et al, 2004). La surexpression de Rad23A ou B entraîne l'accumulation de formes ubiquitinées de p53, alors que leur réduction entraîne sa dégradation protéasomale. Les effets des protéines Rad23 sur la dégradation des protéines seraient donc fortement dépendants de leurs variations stœchiométriques : en excès, elles peuvent inhiber la dégradation protéasomale.

Après un traitement avec des agents endommageant l'ADN comme les UV, l'étoposide ou la mitomycine C, la présence de Rad23B est requise pour l'accumulation et l'activation de p53, et par conséquent pour le déclenchement de l'apoptose (Kaur et al, 2007). Rad23B colocalise avec des formes ubiquitinées de p53 au niveau du promoteur de p21 montrant que ces formes spécifiques de p53, protégées par Rad23B, seraient impliquées dans la réponse transcriptionnelle après un stress génotoxique.

En conclusion, en fonction du contexte cellulaire et de la stœchiométrie des composants, les protéines Rad23A et Rad23B peuvent induire ou inhiber la dégradation de protéines essentielles à la réponse au stress comme XPC et p53. Afin de caractériser les rôles de ces protéines dans la réparation de l'ADN, la plupart des études *in vivo* ont été réalisées chez la souris. Les fonctions de Rad23A et Rad23B chez l'homme restent encore à déterminer.

1.6. Autres fonctions de XPC dans le métabolisme cellulaire

Chaque produit d'un gène XP a un rôle essentiel dans l'élimination ou le contournement réplcatif des lésions, expliquant le taux élevé de mutagenèse et carcinogenèse induites par les UV des patients XP. De nombreuses évidences s'accumulent quant à des fonctions additionnelles des facteurs XP, et qui les impliqueraient plus profondément dans la tumorigenèse.

1.6.1. Signalisation et réponse au stress génotoxique

XPC, en tant qu'initiateur du GG-NER, est un candidat séduisant pour le déclenchement de processus de signalisation après la formation de dommages. Ainsi XPC est impliqué dans la réponse cellulaire aux UV en régulant l'expression de différents gènes. Par exemple la transcription du gène codant pour kin17, une protéine de la réplication de l'ADN, est induite 16 heures après une irradiation aux UVC en fonction de la présence de XPC (Masson et al, 2003). De plus, XPC est nécessaire à l'activation de NF- κ B suite à un traitement aux UV (Muotri et al, 2006).

XPC joue également un rôle dans la réponse cellulaire au cisplatine. La déficience en XPC de cellules humaines entraîne une réduction de la réparation de plasmides traités au cisplatine ainsi qu'une augmentation de la mutagenèse (Chen et al, 2003). Une étude transcriptomique comparative entre des fibroblastes normaux et déficients en XPC traités au cisplatine, a permis de mettre en évidence 861 gènes différentiellement exprimés (Wang et al, 2004a). Ces gènes sont impliqués principalement dans le cycle cellulaire, la prolifération, la transduction du signal et la réparation de l'ADN comme CDK2, la cycline E, PCNA, msh2... L'étude de la réponse cellulaire au cisplatine pourrait permettre de comprendre le mécanisme de résistance de certaines tumeurs au traitement. Il a en effet été montré que le NER pouvait inhiber l'apoptose induite par un traitement au cisplatine en activant ATM, la présence de XPC étant requise pour le recrutement d'ATM sur l'ADN (Colton et al, 2006).

1.6.2. Autres voies de réparation

XPC interviendrait dans l'élimination des mésappariements G/T réparés par le BER (Shimizu et al, 2003). Elle interagit directement avec la thymine DNA glycosylase (TDG) qui

initie le BER des mésappariements G/T générés spontanément par déamination de la 5-méthylcytosine. XPC permettrait le départ de la TDG des sites abasiques résultant de l'excision du mésappariement, contribuant ainsi à diminuer la mutagénèse spontanée. Récemment, un rôle de XPC dans la protection contre les dommages oxydatifs a été évoqué (D'Errico et al, 2006). Comme pour la TDG, XPC serait impliquée dans le chargement et le turnover de l'enzyme OGG1.

Une réduction de la quantité de XPC peut aussi entraîner une intolérance à l'étoposide et aux RI (Despras et al, 2007). Ceci est corrélé à un défaut de réparation des DSB par le NHEJ. La déficience en XPC, certainement en combinaison avec d'autres défauts génétiques, pourrait ainsi contribuer à un défaut de réparation des DSB. Ces fonctions additionnelles pourraient représenter un facteur supplémentaire de risque de cancer, et contribuer à la carcinogénèse accrue observée chez les patients XP-C.

Le rôle de XPC dans la réponse cellulaire après la formation de dommages à l'ADN se diversifie. Cette protéine a une affinité pour de nombreuses structures anormales de l'ADN et peut agir avec différents partenaires pour déclencher les processus de réparation ou de signalisation. Le dernier partenaire identifié de XPC est la centrine 2, une protéine connue pour être impliquée dans la division du centrosome. Cette interaction peut-elle jouer un rôle entre la réparation de l'ADN et la division cellulaire ?

2. Le centrosome

Le centrosome est un organelle cytoplasmique. Il est impliqué dans la maintenance de l'architecture cellulaire grâce à sa fonction de centre organisateur du réseau de microtubules (« MTOC », Microtubules Organization Center). Il permet la nucléation et l'organisation des microtubules (MTs) à l'interphase et lors de la mitose. Il doit être dupliqué pendant la phase S du cycle cellulaire et migrer aux deux pôles du fuseau lors de la mitose. Cet organelle contient plus d'une centaine de protéines présentant des fonctions variées dans le métabolisme cellulaire.

La plupart des tumeurs solides sont aneuploïdes, le gain ou la perte de chromosomes sont attribuées à des mitoses défectueuses entraînant une mauvaise ségrégation des chromosomes (Fukasawa, 2007). Parmi les mécanismes potentiels pouvant induire une instabilité chromosomique, une attention particulière a été portée sur les défauts du centrosome. Ces défauts peuvent être fonctionnels ou numériques, et sont retrouvés dans la majorité des types de tumeurs solides et dans certains cas de leucémies et de lymphomes.

2.1. Structure du centrosome

Le centrosome a été nommé à la fin des années 1800 par Theodor Boveri, basé sur la position centrale de cette structure dans la cellule. Déjà à cette époque il est apparu que les fibres cytoplasmiques et les fuseaux bipolaires des cellules mitotiques étaient focalisés au niveau du centrosome.

Le centrosome est le seul organelle non membraneux des cellules de vertébrés. Il occupe un petit espace (1-2 μm^3), et réside typiquement dans une position juxtanucléaire proche du centre de la cellule. Il est composé de deux sous-structures : une paire de centrioles et le matériel péricentriolaire (PCM ; « PeriCentriolar Material ») (Figure 10, pour revue voir Nigg, 2002 ; Doxsey, 2001 ; Bettencourt-Dias et Glover, 2007 ; Fukasawa, 2007).

Le PCM entoure la paire de centrioles. Il est impliqué dans l'ancrage et la nucléation des MTs cytoplasmiques pendant l'interphase et la mitose. L'élément-clé du PCM est la γ -tubuline qui sert de modèle à la nucléation des MTs au sein d'un complexe multi-

protéique en forme d'anneau appelé γ -TuRC (« γ -Tubulin Ring Complex ») composé de 12 à 14 molécules de γ -tubuline et d'au moins 6 autres protéines (Keating et al, 2000).

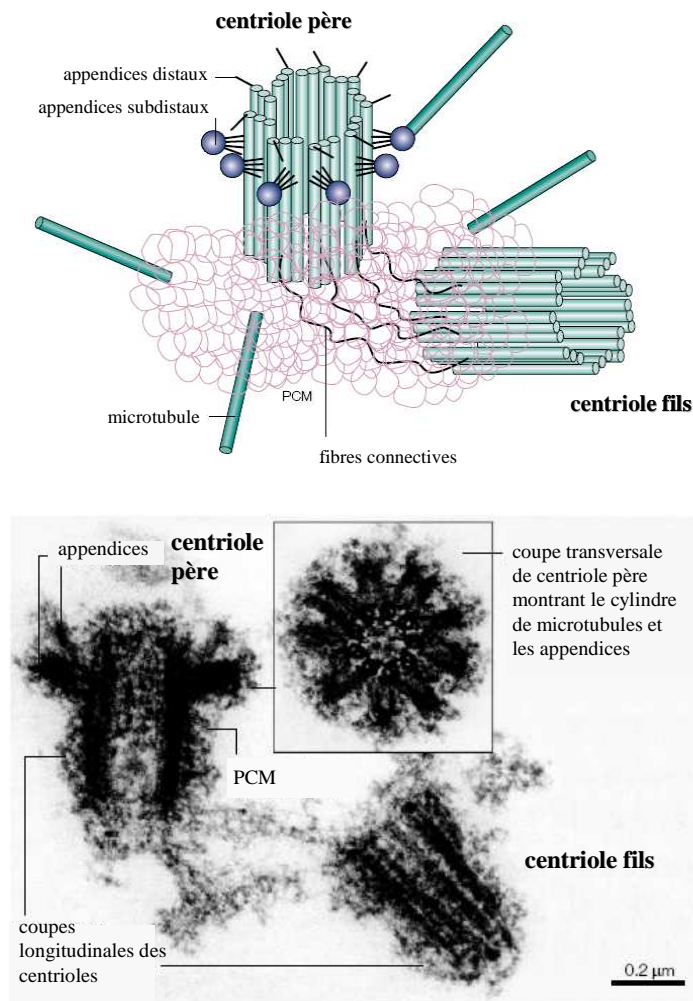


Figure 10. Structure du centrosome (schéma et microscopie électronique). Le centrosome est composé d'une paire de centrioles intégrée dans une matrice protéique, le PCM. Les centrioles ont une structure cylindrique composée de neuf triplets de MTs et sont reliés par des fibres connectives. Le centriole père se distingue du centriole fils par la présence d'appendices dans sa partie distale. La γ -tubuline est un composant majeur du PCM, qui est nécessaire à la nucléation des MTs. (D'après Doxsey, 2001-haut- et Nigg, 2002-bas-)

Les centrioles ont une longueur et un diamètre d'environ 0,5 μ m et 0,2 μ m, respectivement. La forme cylindrique des centrioles est due à l'organisation de neuf triplets de MTs. Les deux centrioles sont perpendiculaires et polarisés le long d'un axe proximo-distal. Le centriole père présente des appendices qui sont absents chez le centriole fils. On distingue des appendices distaux qui permettent l'ancrage des centrioles à la membrane cellulaire, et des appendices sub-distaux impliqués dans l'ancrage du réseau de MTs cytoplasmiques. Les

centrioles n'interviennent pas directement dans la nucléation des MTs cytoplasmiques, mais servent à ancrer le PCM et à déterminer le nombre de MTOC présents dans la cellule, déterminant pendant la mitose.

Outre leur fonction dans l'organisation du réseau de MTs, les centrosomes sont impliqués dans la progression du cycle cellulaire. Le centrosome doit d'ailleurs être dupliqué lors du cycle du centrosome, coordonné avec la réplication de l'ADN.

2.2. Le cycle du centrosome

La duplication du centrosome a lieu une fois par cycle. Elle est semi-conservative, initiée en G1 et contrôlée par des kinases dépendantes des cyclines (CDKs ; Mikule et al, 2007 ; Fukasawa, 2007).

La duplication du centrosome comporte quatre étapes (Figure 11 ; pour revue Hinchcliffe et Sluder, 2001 ; Doxsey et al, 2005) : désorientation et duplication des centrioles, maturation puis séparation du centrosome. En phase G1, il y a tout d'abord désorientation et séparation des centrioles qui perdent leur orientation orthogonale. La duplication est initiée à la transition G1/S et coïncide avec la phosphorylation de protéines centrosomales dépendante de CDK2 (Lacey et al, 1999). L'activation de CDK2-cycline E active alors la duplication des centrioles, la réplication de l'ADN et la progression du cycle cellulaire (Doxsey et al, 2005 ; Fukasawa, 2007). Doxsey et al suggèrent alors un modèle où la division cellulaire requiert l'accomplissement de trois cycles : le cycle du centrosome, le cycle cellulaire et le cycle nucléaire.

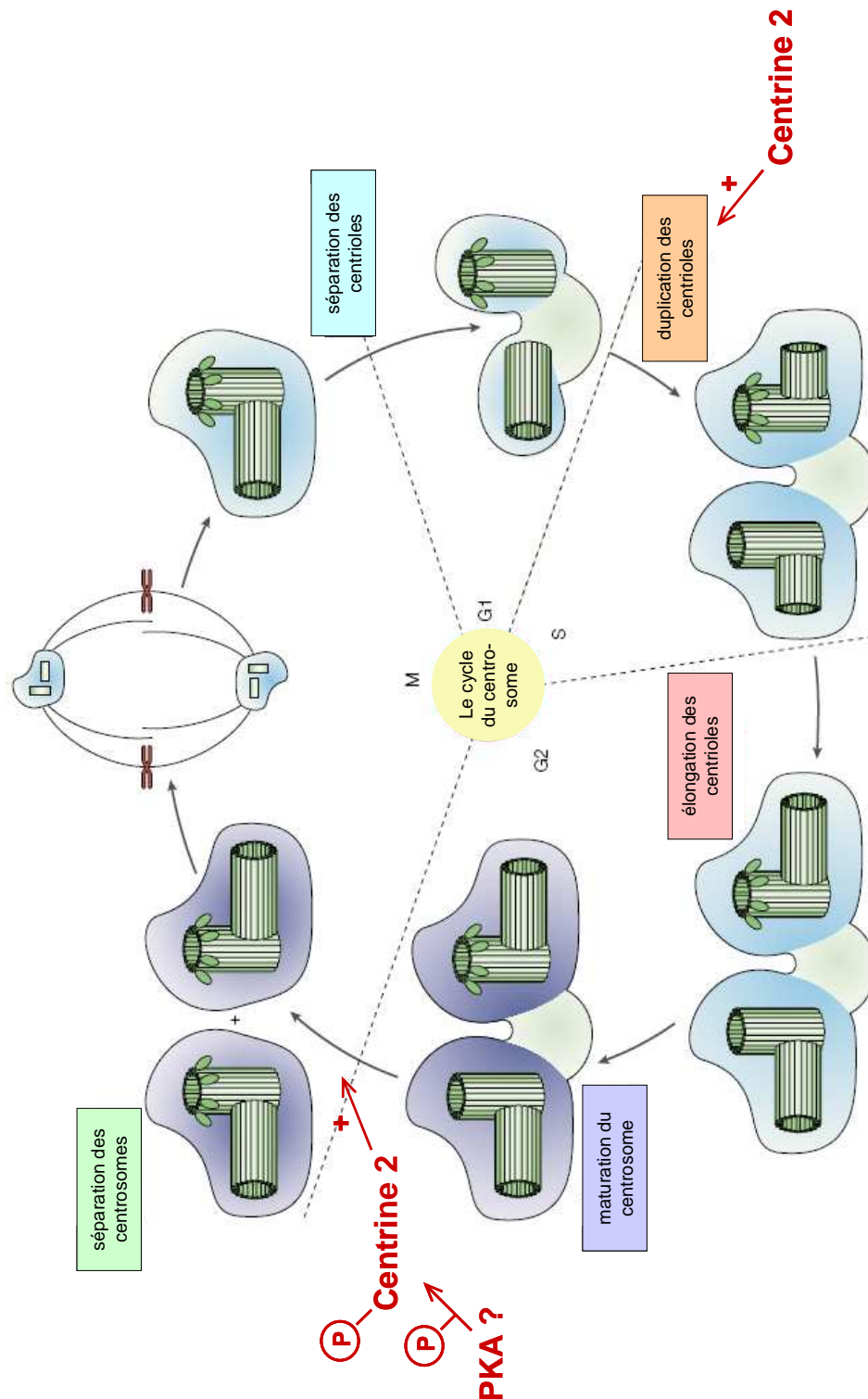


Figure 11. Le cycle de duplication du centrosome. Pendant la mitose, le centrosome est situé au pôle du fuseau mitotique et contient une paire de centrioles. Les deux centrioles ont une orientation orthogonale, qu'ils perdent en fin de mitose. Cette désorientation est un pré-requis pour la duplication des centrioles qui a lieu en fin de la phase G1/début de la phase S. Au niveau morphologique, la duplication est caractérisée par la formation de procentrioles à l'extrémité proximale de chaque centriole parent. Les deux doublets de centrioles se forment (c'est la phase d'élongation) mais continuent de fonctionner comme un unique MTOC jusqu'en fin de phase G2. A la transition G2/M, la maturation du centrosome implique des modifications du PCM. L'activation de protéines-moteur dépendantes des MTs entraîne la séparation des centrosomes et leur migration aux pôles du fuseau. Chaque cellule-fille hérite ainsi d'un centrosome. (D'après Nigg, 2002)

En phase S, la duplication des centrioles entraîne la naissance de pro-centrioles à l'extrémité proximale des centrioles parents. Le centriole père comporterait un site modèle où l'initiation de la formation du centriole fils prendrait place quand les conditions cytoplasmiques deviennent favorables (Duensing et al, 2007). De plus, la taille du PCM permettrait de réguler le nombre de centriole fils naissant: l'augmentation de la taille du PCM suite à la surexpression de péricentrine induit la naissance de multiples centrioles (Loncarek et al, 2008). Les centrioles naissants atteignent une taille maximale en phase G2, mais les deux doublets de centrioles continuent de fonctionner comme un unique MTOC jusqu'en fin de phase G2. Avant la séparation des centrosomes, il y aurait d'abord une disjonction en fin de phase G2 concomitante avec : - l'activité de Nek2, une kinase régulatrice du cycle cellulaire qui contribue à mener la cellule vers la mitose en phosphorylant Cnap-1 (Fry et al, 1998), et - la phosphorylation de la centrine (Lutz et al, 2001). A la transition G2/M, la maturation du centrosome permet au centriole fils de la cellule mère d'acquérir des appendices dans sa partie distale. Il y a également un échange de composants du PCM et le recrutement de γ -TuRC supplémentaires qui est un pré-requis pour augmenter l'activité de nucléation des MTs. L'activation de protéines-moteur dépendantes des MTs induit la séparation des centrosomes en début de mitose. Les deux centrosomes ainsi séparés entraînent la formation du fuseau mitotique.

2.3. Les fonctions du centrosome

Le centrosome est une plateforme pour une multitude de réseaux de signalisation. Il comprend plus d'une centaine de protéines, incluant de larges protéines d'échafaudage (200-450 kDa) à domaine « coil-coil » servant de sites d'ancrage à de nombreuses activités de régulation (Table 3 ; pour revue, Doxsey et al., 2005). Cette activité de plate-forme peut être expliquée par le fait que des réactions peuvent être inefficaces en solution : le premier composant doit se localiser, entrer en contact et modifier sa cible afin d'enclencher les étapes suivantes. La présence de ces composants sur un site commun, une sorte d'échafaudage comme le centrosome, permettra d'augmenter leur concentration locale, de limiter les interactions non-spécifiques, et d'effectuer un contrôle spatial pour des voies de régulation en les positionnant à proximité d'autres cibles (autres voies, autres organelles...).

Catégorie	Nombre de protéines par catégorie	Exemple(s)
Ubiquitylation et dégradation des protéines	23	20S protéasome Ubiquitine
Transport nucléaire/assemblage du fuseau	4	RanBPM
Régulateurs du cytosquelette	22	Aurora/Aik
CDKs et cyclines	5	CDK 2 Cycline B
Régulateurs mitotiques	8	Cdc25B Polo kinase
Chaperonines	3	Hsp70
Apoptose	8	Caspase 3 Rb
Points de contrôle des dommages à l'ADN	4	Brca 1 p53
Voie MAPK	8	p38
Points de contrôle du fuseau	6	Mps1p Topoisomérase II alpha
Sortie de mitose/cytokinèse	9	Centrioline
Cytokinèse	11	Cdc7p
Régulateurs de la transcription	4	Caséine kinase 2
Métabolisme de l'ARN	6	Cycline B mRNA
Régulation G1/S	2	p21
Signalisation Wnt	3	Caséine kinase 1
Signalisation des récepteurs membranaires	13	PI 3-kinase PKA
Autres kinases/phosphatases	7	Pim-1
Régulation du Golgi	2	GAPcenA
Autres enzymes	10	PARP
Protéines de structure/assemblage	60	Actine Ninéine
Protéines associées aux MTs (MAPS)	31	γ -tubuline
Protéines moteurs	15	Dynéine Kinésine
Liaison au calcium	5	Centrine
Autres protéines	30	Ribonucléoprotéine Orc2
Protéines virales et agents infectieux	13	Adénovirus

Table 3. Les différentes catégories des protéines centrosomales. (d'après Doxsey et al, 2005)

2.3.1. Organisation des MTs

Pour organiser le réseau de MTs, le centrosome doit être capable de nucléer, ancrer et relarguer les MTs. La nucléation a lieu dans le PCM. Les principaux composants du PCM sont membres de familles de protéines à domaine « coil-coil » comme la péricentrine et AKAP450, qui forment un dock pour les protéines de la nucléation telle que la γ -tubuline (Bornens, 2002). L'ancrage des MTs a lieu au niveau du PCM et des appendices sub-distaux du centriole père, et dépend de molécules telles que la ninéine, la centrioline ou la dynactine. La ninéine est un composant des appendices sub-distaux du centriole père qui est connecté au centriole par sa partie N-terminale et interagit avec les γ -TuRCs grâce à son extrémité C-terminale (Delgehyr et al, 2005). En absence de ninéine les γ -TuRCs ne peuvent pas ancrer les MTs au centrosome à l'interphase. Le centrosome a donc des capacités variables de nucléation des MTs durant le cycle cellulaire. Il existerait une balance entre des facteurs favorisant ou inhibant le recrutement de molécules d'organisation des MTs à l'interphase et durant la mitose, régulant également la maturation du centrosome. La régulation de ces facteurs fait intervenir la phosphorylation via les kinases aurora A et Polo-like 2, et l'ubiquitylation. Par exemple, l'activité de ligase de l'ubiquitine de Brca1 peut modifier *in vitro* deux résidus de lysine de la γ -tubuline, inhibant ainsi l'activité de nucléation des centrosomes (Sankaran et al, 2007).

2.3.2. Fuseau mitotique et cytokinèse

Le centrosome n'est pas indispensable à l'assemblage du fuseau mitotique dans les cellules de mammifères (Hinchcliffe et Sluder, 2001). Par exemple, les cellules germinales en méiose forment des fuseaux bipolaires acentriolaires. Le centrosome a par contre un rôle essentiel pour l'orientation du fuseau mitotique et l'achèvement de la cytokinèse. En effet, après ablation du centrosome par microchirurgie dans des cellules somatiques de mammifères il n'y a pas de production de MTs astraux pendant la mitose et les fuseaux sont mal positionnés, générant des défauts de fidélité durant la cytokinèse et des perturbations de la division cellulaire (Khodjakov et Rieder, 2001).

Les centrioles sont dynamiques, plus particulièrement durant la mitose et la cytokinèse. En utilisant la centrine couplée à la GFP, il a été observé que le centriole-père, alors localisé au pôle du fuseau d'une des deux futures cellule-fille, se déplaçait jusqu'au pont intracellulaire qui lie les deux cellules filles (Piel et al, 2001). Ce mouvement est corrélé au rétrécissement et à la dépolymérisation du pont avant la séparation des cellules-filles.

La division cellulaire requiert la coordination du cycle du centrosome, du cycle cellulaire et du cycle nucléaire incluant la réplication de l'ADN (Doxsey et al, 2005). Quand la division cellulaire est retardée, il en résulte un arrêt du cycle du centrosome, évitant ainsi la génération de centrosome surnuméraire qui pourrait entraîner une aneuploïdie. Inversement, le centrosome a un rôle direct dans la progression de la division cellulaire, et pourrait ainsi jouer un rôle précoce lors de la transformation cellulaire.

2.3.3. Transition G1/S

Le centrosome a un rôle primordial lors de la transition G1/S. En effet, les cellules se bloquent en phase G1 en absence de centrosome après microchirurgie ou ablation au laser, ou en présence d'un centrosome défectueux après déplétion de certaines protéines du PCM (pour revue, Doxsey et al, 2005 ; Bettencourt-Dias, 2007).

L'arrêt du cycle en phase G1 est dépendant de p53 et p38 (Mikule et al, 2007). La déplétion de 14 protéines centrosomales bloquent des cellules humaines en phase G1, accompagné d'une réduction de l'activité de CDK2. Cet arrêt est précédé par une activation dépendante de p38 et le recrutement de p53 au centrosome. Des cellules déficientes en p53 ne bloquent d'ailleurs plus les cellules en phase G1 et entraînent la formation de fuseaux mitotiques anormaux.

La progression en phase S requiert la liaison de molécules régulatrices du cycle cellulaire au centrosome, comme la cycline E. Cette cycline contient un domaine de localisation au centrosome essentiel pour induire l'entrée des cellules en phase S (Matsumoto et Maller, 2004). L'intégrité du centrosome est donc un pré-requis pour la progression du cycle en phase S.

2.3.4. Transition G2/M

L'association au centrosome de régulateurs du cycle cellulaire est une étape-clé de contrôle de la division cellulaire. En effet, le centrosome entraîne l'entrée des cellules en mitose via la régulation de l'activité et de la localisation de CDK1 et Chk1, et via la kinase Polo. Le complexe CDK1-cycline B est présent au centrosome à l'interphase et induit la division cellulaire lorsqu'il est activé par cdc25b et qu'il s'accumule dans le noyau des cellules. Chk1, un inhibiteur de CDK1, est également localisé au centrosome à l'interphase mais pas dans les cellules mitotiques. A l'interphase, il empêche ainsi une entrée prématurée en mitose en protégeant CDK1 de l'activation par cdc25b (Krämer et al, 2004 ; Löffler et al, 2006). L'entrée en mitose peut également être inhibée en surexprimant la polo-box, le domaine C-terminal du régulateur mitotique Polo, qui est localisé au centrosome (Jang et al, 2002).

2.3.5. Le rôle central de CDK2 dans le lien entre les deux cycles

L'activation de CDK2 en fin de phase G1 coordonne l'initiation de la duplication du centrosome et de l'ADN (Matsumoto et al, 1999). De nombreuses cibles de CDK2 ont été identifiées, dont certaines sont localisées au centrosome et sont impliquées dans sa duplication.

La nucléophosmine est une molécule chaperone qui a de nombreuses activités dans le métabolisme cellulaire comme dans la duplication de l'ADN et le transport nucléocytoplasmique. Cette protéine est fréquemment mutée, sous ou sur-exprimée dans certains cancers (Fukasawa, 2007). Après avoir été phosphorylée par CDK2-cycline E, elle se dissocie du centrosome, ce qui entraîne la séparation des centrioles, événement initial de la duplication du centrosome (Okuda et al, 2002). Dans ce cas, la duplication du centrosome est régulée par une balance association/dissociation de la nucléophosmine au centrosome dépendante de l'activité de CDK2.

Une autre cible de CDK2 est Mps1p, une kinase du point de contrôle du fuseau (Fisk et al, 2003). Elle est activée par CDK2-cycline E au début de la phase S et peut induire la duplication du centrosome. La phosphorylation de Mps1p la protège également de la dégradation protéasomale. Cette régulation permettrait le contrôle restrictif de la duplication du centrosome pendant la phase S (Lange, 2002).

La duplication du centrosome dépend également de la phosphorylation de la protéine Rb, un régulateur négatif du cycle cellulaire, corrélée à l'activation du facteur de transcription E2F et du complexe CDK2-cycline A (Meraldi et al, 1999). L'activation du complexe CDK2-cycline A suit celle du complexe CDK2-cycline E, et reste effective en phases S et G2. La duplication du centrosome et la réplication de l'ADN seraient donc toutes deux dépendantes de la voie Rb.

2.3.6. L'activité protéasomale au centrosome

La voie de dégradation des protéines par la voie de l'ubiquitine-protéasome est fortement dépendante du centrosome. Bien que cette activité puisse prendre place dans tout le cytosol, les protéasomes sont très concentrés dans le centrosome, ce dernier étant alors décrit comme un centre protéolytique. Des cellules HeLa et HEK293 ont été utilisées pour déterminer la localisation de différents composants du protéasome (Wigley et al, 1999 ; Badano et al, 2005). Bien qu'ils soient présents dans différents compartiments subcellulaires, l'ubiquitine, les sous-unités 20S et 19S, et l'enzyme E3 colocalisent avec la γ -tubuline. Après surexpression de protéines mutantes présentant des défauts de repliement, le réseau de protéasomes associé au centrosome s'étend et recrute dans le cytosol des pools supplémentaires de ses composants.

La présence du protéasome au centrosome représenterait une voie efficace de contrôle et de dégradation des protéines mal repliées qui sont générées à proximité dans le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi (Badano et al, 2005). De plus, cette voie de dégradation des protéines est très active durant le cycle du centrosome, régulant le taux de nombreuses protéines régulatrices (Lange, 2002).

2.3.7. Le centrosome dans la réponse aux dommages de l'ADN

Existe-t-il un lien entre le cycle du centrosome et la réponse cellulaire au stress ? Au cours de l'embryogenèse chez la drosophile, l'inactivation du centrosome ferait partie d'un système de contrôle des dommages qui entraîne un blocage de la ségrégation des chromosomes quand les points de contrôle de la réplication sont défectueux (Sibon et al, 2000 ; Figure 12). Chk2, en se localisant au centrosome, serait impliqué dans la disruption du centrosome (Takada et al, 2003).

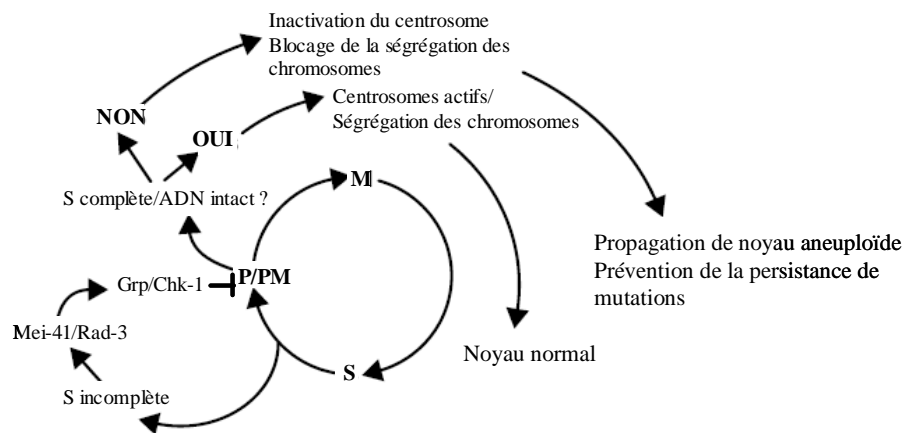


Figure 12. Contrôle des dommages de l'ADN dans des embryons précoces de drosophile. Les embryons de drosophile ont un cycle cellulaire simplifié composé d'une phase de synthèse d'ADN (S) et de mitose (M). Des défauts dans la réplication de l'ADN entraînent un blocage du cycle en prophase/prométaphase (P/PM). Quand les points de contrôle sont défectueux et que la mitose est initiée avant la phase S ou que l'ADN n'est pas réparé, il y a une inactivation du centrosome dépendante de l'intégrité de l'ADN qui entraîne des défauts d'assemblage du fuseau et empêchent la ségrégation des chromosomes. (D'après Sibon et al, 2000)

Dans des cellules HeLa, la séparation des centrosomes peut être inhibée suite à la formation de dommages à l'ADN (Fletcher et al, 2004). Les activités d'ATM et de la kinase Polo-like 1 seraient impliquées dans l'inactivation du centrosome à la transition G2/M après des radiations ionisantes (Zhang et al, 2005). La kinase Polo-like 1 peut phosphoryler et activer Nek2, un régulateur-clé de la séparation des centrosomes. L'inactivation de cette kinase entraîne ainsi l'inhibition de Nek2 et empêche la séparation des centrosomes. L'inactivation du centrosome en réponse aux dommages de l'ADN contribuerait donc à la maintenance du point de contrôle G2.

En présence d'ADN endommagé, l'entrée de cellules de hamster en mitose peut entraîner la formation de structures ressemblant aux centrosomes, de fuseaux multipolaires et provoque des erreurs de division (Hut et al, 2003). Ces cellules présentent l'avantage de pouvoir progresser en mitose après traitement des cellules à la mitomycine C. Cette étude démontre bien les conséquences de la persistance d'ADN endommagé sur la division cellulaire via le centrosome.

2.4. Centrosome et cancer

Durant la mitose, les deux centrosomes induisent la formation d'un fuseau bipolaire qui permet la ségrégation des chromosomes. Des copies supplémentaires du centrosome peuvent provoquer la formation de fuseaux multipolaires, et une séparation défectueuse des centrosomes peut être responsable de l'apparition d'asters monopolaires. De plus, le centrosome détermine le positionnement du plan de clivage durant la cytokinèse, essentiel pour assurer une division symétrique et la morphogénèse cellulaire. Il faut toutefois noter que de multiples centrosomes n'entraînent pas systématiquement une mitose anormale, la cellule pouvant par exemple inactiver les centrosomes surnuméraires (Sluder et Nordberg, 2004).

Un nombre anormal de centrosomes peut causer une mauvaise ségrégation des chromosomes. En conséquence, le gain ou la perte de chromosomes accélérera la progression tumorale en induisant de multiples altérations génétiques requises pour l'acquisition d'un phénotype tumoral, comme la perte de gènes suppresseurs de tumeur ou l'amplification d'oncogènes. L'importance du maintien de l'intégrité du centrosome ne fait plus de doute, mais une question demeure : les défauts du centrosome sont-ils la cause ou la conséquence de la tumorigénèse ?

2.4.1. L'amplification du centrosome : types de défauts

Des anomalies du centrosome sont très communes dans des lignées cellulaires dérivées de tumeurs et dans des modèles de tumeurs animales, et elles sont également retrouvées dans des tumeurs primaires et métastatiques. En effet, l'amplification du centrosome est une caractéristique retrouvée dans de nombreuses tumeurs (D'Assoro et al, 2002). Ce terme regroupe différentes anomalies incluant une augmentation de la taille du centrosome par rapport à un tissu sain, une augmentation du nombre de centrioles ou de centrosomes. Les centrosomes « amplifiés » peuvent également montrer une hyperphosphorylation de protéines centrosomales comme la centrine ou une altération des fonctions du centrosome comme une capacité accrue de nucléation des MTs.

Pour caractériser les défauts du centrosome, des analyses systématiques ont été réalisées dans des carcinomes de cancer du sein et des modèles murins de cancer de la prostate (Lingle et Salisbury, 1999 ; Schatten et al, 2000). Une multitude d'anomalies du

centrosome a été recensée (exemples dans la Figure 13) comme une augmentation du nombre de centrioles, un excès de PCM, une mauvaise orientation des centrioles ainsi que la polarité inversée de la localisation du centrosome (par exemple un centrosome retrouvé au pôle basal d'une cellule au lieu du pôle apical). Ces défauts structuraux du centrosome ont été décrits comme une cause potentielle de la perte de l'architecture cellulaire et tissulaire dans ces tumeurs. Ils seraient dus à un défaut d'organisation du MTOC et de nucléation des MTs qui, associé à une mauvaise ségrégation des chromosomes peut induire une aneuploïdie.

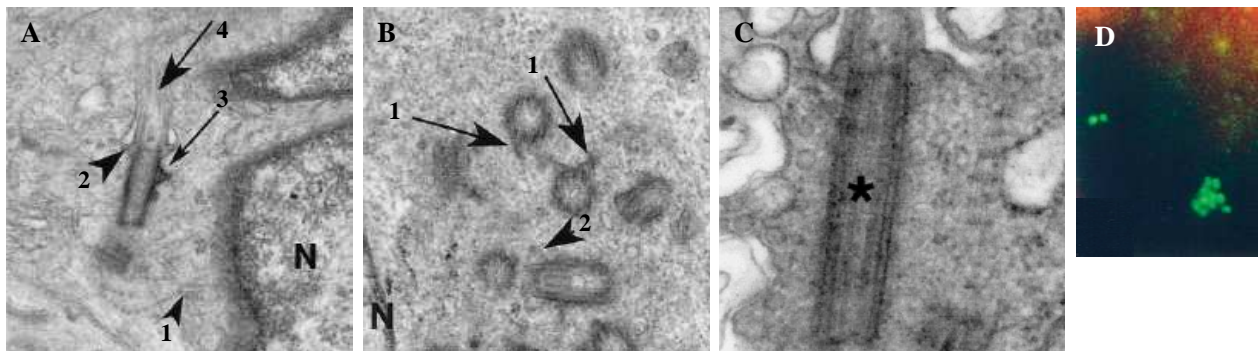


Figure 13. Exemple de défauts du centrosome retrouvés dans des adénocarcinomes de cancer du sein. (A à C) : microscopie électronique. A : épithélium de sein normal, où l'on distingue le centriole mature et le centriole immature (section oblique). On peut voir de fines fibres entre la paire de centrioles et le noyau (1), les appendices distaux (2) et subdistaux (3) et le site d'émergence du cil primaire (4) du centriole mature. (B) : dans cette tumeur du sein, il y a au moins neuf profils centriolaires dont certains présentent des appendices distaux (1) ou subdistaux (2). (C) : ce centriole est au moins deux fois plus long que les centrioles normaux. (D) : immunofluorescence de la centrine de la même tumeur présentée en B, où l'on distingue une paire normale de centriole et des agrégats de centrine de la taille de centrioles. (D'après Lingle et Salisbury, 1999)

2.4.2. L'amplification du centrosome et la dérégulation des points de contrôle

L'homéostasie du centrosome est perturbée dans des tumeurs portant des mutations de p53 ou Rb ou ayant une activité dérégulée de CDK2 et/ou d'autres kinases mitotiques (D'assoro et al, 2008). Une majorité de ces protéines régulatrices de la division cellulaire sont fréquemment mutées ou surexprimées dans de nombreux cancers (pour revue, Fukasawa, 2007). Des mutations de p53 associées à une surexpression de la cycline E augmente de manière synergique la fréquence d'amplification du centrosome dans des cellules en culture et des tumeurs dérivées de souris p53^{-/-} (Mussman et al, 2000). Les gènes suppresseurs de

tumeur Brca1 (Xu et al, 1999) et Brca2 (Tutt et al, 1999) ont été impliqués dans l'inhibition du point de contrôle du cycle du centrosome. Des MEFs portant ces gènes délétés montrent une altération du point de contrôle G2/M, une amplification du centrosome et des mitoses aberrantes. Ceci suggère qu'un dérèglement de la balance entre régulateurs positifs et négatifs de la division cellulaire peut accélérer les défauts du centrosome (D'Assoro et al, 2002).

L'amplification du centrosome peut également se développer dans les premières étapes de la tumorigenèse. Les papillomavirus humains (HPV) de type 16 et 18 portent respectivement les oncogènes viraux E6 et E7 qui sont impliqués dans l'amplification du centrosome de cellules humaines (Duensing et al, 2001). E6 inactiverait p53 alors qu'E7 induirait l'amplification du centrosome en inactivant la voie Rb. Ces oncoprotéines, mises en cause dans 90% des cancers cervicaux, démontrent une voie possible d'implication de l'amplification du centrosome dans les premières étapes de la tumorigenèse.

2.4.3. L'amplification du centrosome, l'instabilité génétique et l'aneuploïdie

L'aneuploïdie est une forme d'instabilité génétique caractérisée par le gain ou la perte de chromosomes entiers. Elle apparaît généralement tôt dans le développement tumoral, suggérant un rôle aussi bien dans la tumorigenèse que dans la progression tumorale. L'aneuploïdie accentue en fait l'hétérogénéité phénotypique des cancers reflétant l'instabilité inhérente de leurs génomes appelée instabilité chromosomique. Les aberrations chromosomiques sont d'ailleurs fréquentes dans des cancers particulièrement avancés et agressifs, et sont utilisés comme un marqueur pronostic de la progression tumorale (Nigg, 2002). Qu'en est-il des anomalies du centrosome ? Le degré d'instabilité génétique peut être corrélé au degré de défauts du centrosome dans de nombreux types de cancer comme le cancer du sein (Lingle et al, 2002). Dans cette étude tous les carcinomes *in situ* montrent une amplification significative du centrosome alors que seul 35% sont aneuploïdes, suggérant que l'amplification du centrosome pourrait être un événement précoce qui intervient avant l'invasion tumorale.

Ces anomalies sont communes dans des cancers invasifs. Elles ont été détectées dans des tumeurs de bas grade et dans des carcinomes *in situ* de sein, du col de l'utérus et de la prostate (Pihan et al, 2003). Une forte amplification du centrosome est reliée à une forte instabilité génétique et un haut grade histologique qui lui est directement lié au risque de

progression en carcinome invasif. Les auteurs suggèrent un modèle où les centrosomes contribuent aux changements cytologiques et génétiques qui surviennent durant la progression des lésions précancéreuses.

Toutes ces études confortent l'hypothèse que les anomalies du centrosome peuvent constituer une cause importante de l'instabilité génétique qui sera à l'origine de la progression de la tumeur à un stade plus avancé. L'amplification du centrosome est caractéristique des tumeurs en général, et elle est particulièrement prononcée dans des stades avancés de la progression tumorale. Elle pourrait donc être utile pour suivre la progression tumorale et la diversité phénotypique des cancers (D'Assoro et al, 2002). De plus, en association avec d'autres facteurs pronostics, elle pourrait permettre de prédire l'issue et la survie des patients atteints de cancer.

2.5. La centrine

Le nombre, la direction et la polarité des MTs sont généralement organisés grâce à un unique MTOC. Les MTOCs diffèrent en apparence dans de nombreuses espèces eucaryotes. Chez les algues vertes biflagellées comme *Chlamydomonas*, chaque flagelle est organisé par un corps basal. Chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*, les fonctions du MTOC sont assurées par le « spindle pole body » (SPB) qui ne contient pas de centriole. Chez les mammifères, le centrosome comporte deux centrioles entourés du PCM. Certains composants de ces structures sont très conservés au sein de tous ces organismes comme la γ -tubuline et la centrine. La centrine fait en effet partie des 347 « protéines signatures » qui sont uniques aux cellules eucaryotes et ne présentent pas d'homologie significative avec des protéines bactériennes (Hartman et Fedorov, 2002).

2.5.1. La centrine chez les eucaryotes inférieurs

2.5.1.1. Origine

La centrine est une protéine ancienne qui serait apparue chez un ancêtre commun des eucaryotes par duplication de gènes (Paoletti et al, 1996). La famille des centriques est membre d'une super-famille de protéines à mains-EF qui lient le calcium (Ca^{2+}). Elle a été identifiée dans les corps basaux d'algue verte où elle est directement responsable de la

contraction de fibres sensibles au Ca^{2+} . Chez les organismes unicellulaires, c'est le constituant majeur des fibres contractiles Ca^{2+} -dépendantes associées aux MTOCs (Gogendeau et al, 2008). Cette contraction est nécessaire pour la localisation, l'orientation et la ségrégation des corps basaux pendant la mitose. Les fonctions des centrines sont relativement conservées, au sein du simple corps basal jusqu'au centrosome.

2.5.1.2. *Cdc31p*

Chez la levure *S. cerevisiae*, le produit du gène *Cdc31p* a été isolé par criblage génétique de mutants de la division cellulaire. C'est un composant du site d'assemblage du nouveau SPB appelé demi-pont (Spang et al, 1993). Elle est nécessaire à l'initiation de la duplication du SPB : des mutants de *Cdc31p* inhibent cette duplication et se bloquent en mitose avec un fuseau mitotique monopolaire organisé autour d'un unique SPB (Paoletti et al, 2003).

Trois partenaires de *Cdc31p* ont été identifiés et ils sont tous nécessaires à la duplication du SPB : *Kar1p* (Vallen et al, 1994), *Mps3p* (Jaspersen et al, 2002) et *Sfi1p* (Kilmartin, 2003). Des mutants de *Kar1p* et *Mps3p* ont le même phénotype que ceux de *Cdc31p*, suggérant que ces protéines interviendraient toutes dans une même étape précoce de la duplication du SPB. *Kar1p* et *Mps3p* induiraient le recrutement de *Cdc31p* au demi-pont. *Sfi1p* lie de nombreuses molécules de *Cdc31p* grâce à une série de répétition de domaines de liaison, et ce complexe forme des fibres contractiles sensibles au Ca^{2+} qui réorientent les centrioles. Cette interaction représente un modèle où la centrine aurait un rôle dans la dynamique et dans la duplication des MTOCs (Salisbury, 2004). Il est intéressant de noter que la centrine 2 humaine interagit avec la protéine centrosomale *hsfi1* (Martinez-Sanz et al, 2006).

Cdc31p interagit également avec une kinase *Kic1p* (Sullivan et al, 1998). *Kic1p* n'est pas requise pour la duplication du SPB, mais interviendrait dans la morphogénèse cellulaire grâce à son interaction avec *Cdc31p*. Les auteurs suggèrent que *Cdc31p* coordonnerait ainsi deux processus cellulaires distincts, la duplication du SPB et l'initiation de la croissance cellulaire.

2.5.1.3. Autres eucaryotes inférieurs

La centrine est très conservée mais il y a une très grande variabilité du nombre de gènes chez les eucaryotes : il n'y a qu'un seul gène chez la levure, 4 chez les mammifères, 7 chez *Leishmania*, au moins 10 chez *Tetrahymena* et 49 chez la paramécie. Chez cette dernière, il y a dix sous-familles de centrines qui pourraient jouer un rôle dans la coordination entre la duplication et le positionnement des organelles corticales (Gogondeau et al, 2008).

Chez les organismes unicellulaires, en plus de son rôle dans la duplication, la ségrégation et le positionnement des MTOCs, la centrine est un constituant majeur de fibres contractiles sensibles au Ca^{2+} . L'effet de la disruption de la centrine a été étudié dans de nombreux organismes. Par exemple chez *Leishmania*, les cellules de parasites mutants LdCEN-/- se bloquent à la transition G2/M du cycle cellulaire et la duplication des corps basaux est arrêtée (Selvapandiyan et al, 2004). Ces cellules présentent alors de multiples noyaux et kinétochores. Chez l'algue verte *Chlamydomonas*, l'utilisation de RNAi dirigé contre la centrine a montré qu'elle était requise pour la duplication, la ségrégation et la maturation des corps basaux (Koblenz et al, 2003). Chez la paramécie, la déficience en PtCen2 et PtCen3 affecte la géométrie de la duplication des corps basaux (Ruiz et al, 2005). Il en résulte un arrêt de croissance et une réduction du nombre de corps basaux, sans affecter leur assemblage. Les fonctions des centrines sont donc bien conservées chez tous ces organismes.

2.5.1.4. Les centrines de mammifères

Chez l'homme, deux ADNc codant pour la centrine ont tout d'abord été clonés (Errabolu et al, 1994). Leur identification a été réalisée grâce à des anticorps dirigés contre la centrine de *Chlamydomonas*. Ces anticorps, utilisés dans des cellules HeLa, ont montré une localisation au centrosome et aux pôles des fuseaux mitotiques. Les deux ADNc nommés HsCen-1 et HsCen-2 sont identiques à 90%. Les gènes codant pour la centrine 1 et 2 sont localisés sur les chromosomes 18 et X, respectivement. Un autre gène HsCen-3 a ensuite été identifié, partageant plus d'homologies avec Cdc31p (Middendorp et al, 1997).

La centrine 1 est spécifiquement exprimée dans les cellules germinales mâles et les cellules ciliées, les centrines 2 et 3 ont une expression ubiquitaire. La centrine 3 présente seulement 54% d'homologies avec les deux autres centrines, la centrine 1 et 2 en partagent 84%. Durant la prolifération cellulaire, seules les centrines 2 et 3 sont présentes alors que durant la différenciation des cellules ciliées, les trois centrines sont exprimées (Laoukili et al,

2000). La centrine 1 serait impliquée dans le battement Ca^{2+} -dépendant des cils de ces cellules.

Récemment une quatrième centrine, murine, a été mise en évidence (Gavet et al, 2003). Elle est très proche de la centrine 2 mais ne reconnaît pas les mêmes partenaires centriolaires : la centrine 2, mais pas la centrine 4, peut lier *in vitro* de manière Ca^{2+} -dépendante un partenaire de Cdc31p, Kar1. La centrine 4 est exprimée dans des cellules ciliées du cerveau, des reins, des poumons et des ovaires, et serait plus précisément impliquée dans l'assemblage des corps basaux. Il existe donc, à l'heure actuelle, quatre centrines différentes chez les mammifères. Deux d'entre elle, la centrine 2 et 3, ont une expression ubiquitaire et une fonction lors de la division cellulaire. Les deux autres centrines 1 et 4, ont une expression tissu-spécifique avec une activité plus spécifique comme la maintenance des cellules ciliées.

2.5.2. Localisation et structure de la centrine 2 humaine

2.5.2.1. Localisation de la centrine 2 humaine

Suite à un fractionnement cellulaire, des anticorps anti-centrine réagissent avec trois types de fractions protéiques issues de lymphoblastes humains : deux fractions, soluble et insoluble au triton X-100, et une fraction fortement enrichie en centrosomes isolés (Paoletti et al, 1996). Ces anticorps reconnaissent la centrine 1 et 2, mais l'utilisation de cellules non ciliées a permis une visualisation spécifique de la centrine 2. Plus de 90% de la centrine 2 n'est en fait pas associée aux centrioles.

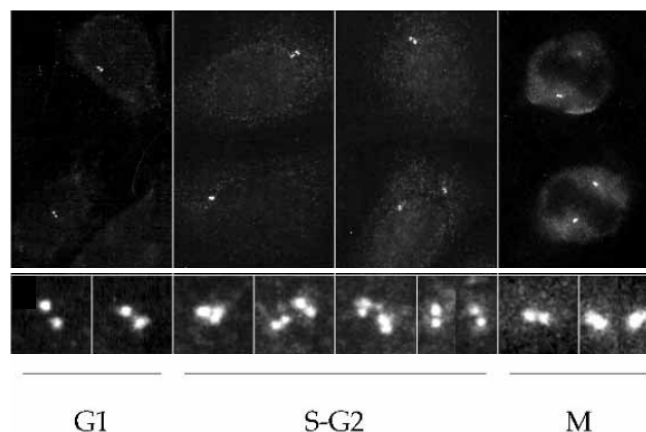


Figure 15. Localisation de la centrine aux centrioles pendant le cycle cellulaire. En début de phase G1, les centrioles sont très proches, et commencent à se dissocier pendant en fin de phase G1. Pendant la phase S, on distingue quatre centrioles et en phase M, les deux centrioles sont indistingables. (D'après Paoletti et al, 1996)

Dans le centrosome, la centrine 2 est localisée au niveau des centrioles alors que la centrine 3 se situe dans le PCM. La centrine 2 est présente au niveau des centrioles pères et fils, plus précisément dans la lumière de leur partie distale. Par immunofluorescence, dans des cellules HeLa, le marquage présente un signal léger et homogène dans le cytoplasme et le noyau, et un signal intense au niveau des centrioles (Figure 15).

2.5.2.2. Structure de la centrine 2 humaine

La centrine est une protéine à main-EF qui lui permet de lier le Ca^{2+} (Figure 16). C'est une protéine de 172 acides aminés qui a une taille de 19 kDa. La centrine a une structure flexible et possède deux domaines distincts. Le domaine N-terminal est moins bien conservé que le domaine C-terminal, très proche dans les différentes centrines de mammifères et celle de *Chlamydomonas*. Elle possède quatre mains-EF qui ont une affinité différentielle pour le Ca^{2+} . Le domaine N-terminal ne contient aucun (centrine 1 et 2) ou un (centrine 3) site actif de liaison au Ca^{2+} , le domaine C-terminal en possède toujours deux. Le domaine N-terminal de la centrine 2 a une structure stable et présente une très faible affinité pour le Ca^{2+} (10^{-2} - 10^{-3} M⁻¹), suggérant que les sites de liaison au Ca^{2+} physiologiquement actifs sont situés dans la partie C-terminale de la protéine (Craig et al, 2006). Le domaine C-terminal est peu structuré en absence de Ca^{2+} . En incluant l'hélice D du domaine N-terminal, cette construction présente une structure unique, modulée par la liaison du Ca^{2+} (Yang et al, 2006). Quand elle est saturée en Ca^{2+} , la centrine 2 a une structure similaire à d'autres domaines régulateurs de type main-EF et présente une interaction inattendue entre le segment N-terminal et le cœur hydrophobe, qui stabilise considérablement la protéine (Matei et al, 2003). Les molécules de centrine 2 peuvent ainsi adopter une conformation supramoléculaire en s'auto-assemblant par les 25 premiers résidus de façon dépendante du Ca^{2+} .

Dans la partie conservée C-terminale, il y a un motif consensus de phosphorylation des protéines typique des sérine/thréonine kinases. Ce motif KKTSLY est absent de la centrine 3, des centrines des eucaryotes inférieurs qui n'ont pas de centrioles et des centrines qui se localisent sur d'autres structures cellulaires que les centrioles (Salisbury, 2007).

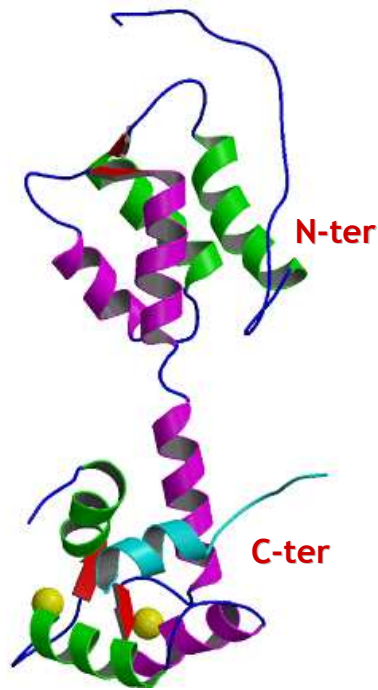


Figure 16. Structure cristallographique de la centrine 2 de mammifères. Les deux domaines possèdent chacun 2 mains EF. Le domaine N-terminal contient 25 premiers acides aminés non structurés en absence de Ca^{2+} et 4 hélices α antiparallèles. Le domaine C-terminal peut adopter une conformation telle que la protéine pourra lier des partenaires amphiphiles. (D'après G.Craescu)

2.5.3. Fonctions de la centrine 2 humaine

2.5.3.1. Phosphorylation et séparation des centrosomes

La centrine est phosphorylée dans son extrémité C-terminale au niveau du résidu serine 170 au moment de l'entrée des cellules en mitose et de la séparation des centrosomes (Lutz et al, 2001). Elle présente un motif consensus qui est la cible de la protéine kinase A. Cette modification post-traductionnelle intervient très tôt dans la mitose, quand les deux centrosomes se séparent pour mettre en place le fuseau mitotique (Figure 11). En effet, dans des cellules HeLa, des anticorps dirigés spécifiquement contre la centrine phosphorylée se localisent au centrosome en phase G2/M. La présence de la centrine phosphorylée reste élevée jusqu'en métaphase, puis diminue pour atteindre un niveau basal à la télophase. La chronologie de phosphorylation de la centrine implique que cette modification pourrait initier la séparation des centrosomes et donc la formation du fuseau mitotique. Dans des cellules interphasiques, la stimulation de l'activité de la PKA entraîne la phosphorylation de la centrine et la séparation des centrioles, suggérant que la phosphorylation de la centrine au résidu sérine 170 pourrait être aussi impliquée dans la séparation des centrioles.

Dans des adénocarcinomes du sein (Lingle et al, 1998), les centrosomes présentent de nombreuses anomalies comme une augmentation de leur nombre et de leur volume, une accumulation de PCM, et des centrioles surnuméraires. Il a été observé également une phosphorylation anormale de la centrine. Dans des cellules épithéliales de sein normales, la centrine phosphorylée est détectée pendant la mitose. Dans les adénocarcinomes, la phosphocentrine est détectée tout au long du cycle cellulaire, et elle s'accumule dans de larges centrosomes tumoraux. L'hypertrophie centrosomale a été détectée dans 34 des 35 adénocarcinomes étudiés. La phosphorylation anormale de la centrine pourrait être une conséquence de la dérégulation du cycle cellulaire dans ce type de cancer.

2.5.3.2. Duplication des centrioles

L'interférence ARN a été utilisée pour étudier le rôle de la centrine 2 lors de la division cellulaire des cellules humaines (Salisbury et al, 2002 ; Rice et Agard, 2002). Un siRNA dirigé spécifiquement contre l'ARNm de la centrine 2 a permis de réduire de 90% son niveau d'expression dans des cellules HeLa. Une réduction du nombre de centrioles a été observée dès 48 heures après transfection, où des cellules peuvent présenter aucun, un ou deux centrioles. Une analyse quantitative montre une réduction progressive du nombre de centriole, accompagnée de la formation de fuseaux mitotiques monocentriolaires ou acentriolaires.

Les auteurs suggèrent un modèle où la centrine 2 a un rôle essentiel dans la duplication des centrioles (Figure 17). Après réduction de l'expression de la centrine 2, il n'y a pas eu de duplication des centrioles. Pendant la mitose, chaque cellule fille a hérité d'un centriole unique qui a pu mettre en place les pôles du fuseau et achever la cytokinèse. A la division suivante, quand la cytokinèse a pu avoir lieu, une cellule fille aura reçu un centriole alors que la deuxième sera acentriolaire. Il a ainsi été observé de nombreux fuseaux mitotiques anormaux qui sont la conséquence de défauts de cytokinèse aux cycles précédents. Finalement, à partir de 72 heures, la majorité des cellules se détachent de leur support et meurent. La duplication des centrioles requerrait donc la présence de la centrine 2.

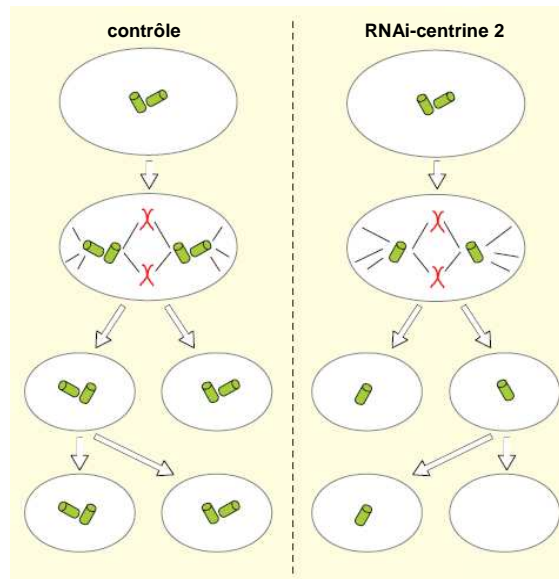


Figure 17. Modèle représentant l'effet de la réduction de centrine 2 sur la duplication des centrioles. La cellule contrôle complète la duplication de ses centrioles (vert), et chaque centrosome mitotique (rouge) contient deux centrioles. La cellule présentant une faible quantité de centrine 2 ne peut pas dupliquer ses centrioles. Les centrosomes mitotiques sont constitués d'un seul centriole incapable de se répliquer. La division suivante génère des cellules unicentriolaires ou acentriolaires. Cette « dilution » de centrioles entraîne irrémédiablement la mort cellulaire. (D'après Rice et Agard, 2002)

2.5.3.3. Un rôle dans l'export de l'ARNm et des protéines ?

Cdc31p et la centrine 2 seraient impliquées dans l'export de l'ARNm. Chez la levure, Cdc31p est localisée dans le SPB et au niveau des pores nucléaires. Une séquence appelée CID, un domaine C-terminal du facteur d'export nucléaire Sac3 recrute Cdc31p dans un complexe Sac3-Thp1-Sus1 impliqué dans l'export de l'ARNm. De plus, certaines mutations du gène Cdc31p entraînent un défaut dans l'export de l'ARNm (Fischer et al, 2004).

Chez les vertébrés, le pore nucléaire est composé d'une multitude de nucléoporines comme le complexe Nup107-170. Un certain nombre d'entre elles ont également un rôle durant la mitose : elles se localisent au kinétochore et/ou au pôle du fuseau mitotique. Par exemple, le complexe Nup107-160 est essentiel pour l'export de l'ARNm, l'assemblage et la structure du pore nucléaire mais il est également indispensable à un assemblage correct du fuseau (Orjalo et al, 2006). Une interaction entre la centrine 2 et ce complexe a été mise en évidence chez les mammifères et le xénope (Resendes et al, 2008). Après une fixation classique au formaldéhyde, le traitement de cellules HeLa à la digitonine permet de visualiser

la présence de la centrine 2 au bord du noyau et la colocalisation de la centrine 2 avec des nucléoporines à l'interphase. En utilisant l'interférence ARN dirigée contre l'ARNm codant pour une protéine d'assemblage du pore nucléaire ELYS/MEL-28, il y a une réduction du signal de la centrine 2 au niveau de la membrane nucléaire. De plus, la surexpression des domaines N et C-terminaux de la centrine 2 provoque l'accumulation d'ARN poly(A)⁺ dans le noyau des cellules, indiquant que la centrine 2 a un rôle fonctionnel dans l'export de l'ARNm. Enfin, la surexpression des deux domaines de la centrine 2, et pas de Nup160, inhibe l'export des protéines alors qu'elle n'a aucun effet sur leur import. La centrine 2 pourrait donc être impliquée dans l'export de l'ARNm mais aussi des protéines. Il a été observé que le Ca²⁺ pouvait influencer la structure et la fonction du pore nucléaire. L'identification de la centrine 2 au pore nucléaire en fait un senseur possible du Ca²⁺ dans ces structures particulières.

La centrine 2, identifiée au niveau du MTOC et étudiée pour son rôle dans le centrosome et la division cellulaire aurait donc d'autres fonctions. Comme d'autres protéines centrosomales, la centrine 2 est présente en quantité non négligeable dans le noyau des cellules mais leurs rôles précis et l'éventuelle relation entre leurs fonctions centrosomales et nucléaires demeurent peu connues à ce jour. La découverte récente de son interaction avec XPC suggère un lien entre la réparation de l'ADN et la division cellulaire.

3. L'interaction XPC/centrine 2

3.1. Première étude

Au début des années 2000, la centrine 2 a été identifiée dans un complexe comprenant XPC et Rad23B (Araki et al, 2001). Des complexes XPC/Rad23B ont été purifiés à partir d'extraits nucléaires de cellules HeLa en utilisant quatre étapes chromatographiques. Différentes fractions ont été testées pour leur capacité à compléter des extraits de cellules de patients XP-C. Cette préparation a permis d'obtenir des fractions 10 fois plus concentrées que dans des précédentes études. Le profil d'éluion des fractions complétant la déficience en XPC a montré la présence de XPC, Rad23B, de bandes dérivant de la dégradation de XPC et d'une bande supplémentaire de faible poids moléculaire. Une analyse par séquençage a révélé une protéine de 19 kDa, la centrine 2. Pour confirmer que la centrine 2 prenait bien part à un complexe avec XPC et Rad23B, une immunoprécipitation a été réalisée sur des extraits totaux de cellules HeLa avec des anticorps anti-XPC et anti-Rad23B. Dans les deux cas, la centrine 2 co-précipite avec les anticorps. La plupart de la centrine 2 présente dans l'extrait co-précipite avec XPC, et une quantité plus faible mais significative co-précipite avec Rad23B. Par colonne d'affinité, la centrine 2 recombinante étiquetée par des molécules d'histidine et liée sur une résine a permis de retenir XPC mais pas Rad23B. Ceci indique que la centrine 2 lie directement XPC.

Le rôle de l'hétérotrimère XPC/Rad23B/centrine 2 dans le NER a été étudié grâce à un système de réparation *in vitro* reconstitué avec les protéines purifiées XPA, RPA, XPF, XPG le facteur TFIIH partiellement purifié, et les différentes protéines du complexe XPC. Une activité NER est détectable en présence de XPC seul, alors que la centrine 2 et Rad23B seules ne peuvent pas stimuler le NER. L'association Rad23B+XPC peut induire la réparation, mais pas la centrine 2+XPC. La combinaison de Rad23B et de la centrine 2 associées à XPC ne produit pas d'effet significatif sur l'efficacité de réparation. Ceci peut être dû aux limites de ce test de réparation réalisé avec un ensemble de protéines indépendamment purifiées. Des complexes ont alors été isolés à partir de cellules d'insectes infectées par des baculovirus exprimant XPC et Rad23B avec ou sans la centrine 2. Les complexes formés des trois protéines ont montré la meilleure activité NER, légèrement supérieure au dimère XPC/Rad23B. Il a enfin été montré que la centrine 2 pouvait stabiliser XPC sur la lésion en coopération avec Rad23B : la liaison de différentes combinaisons de protéines à de l'ADN

endommagé a été testée après une pré-incubation de ces protéines à différentes températures. On sait que XPC seul peut se lier à l'ADN endommagé. Mais elle perd cette capacité après une pré-incubation à partir de 37°C et jusqu'à 50°C. Elle la retrouve quand Rad23B est présente, et elle est encore augmentée quand la centrine 2 est associée à Rad23B. En conclusion, la centrine 2 contribuerait au NER au moins *in vitro* en se liant et en stabilisant XPC sur l'ADN, en fonction de la présence de Rad23B.

3.2. Analyses structurales

Des méthodes bioinformatiques et des expériences de calorimétrie de titrage isotherme (ITC, « Isothermal Titration Calorimetry ») ont permis de caractériser l'interaction entre ces deux protéines. Une séquence peptidique de 17 acides aminés de XPC (N₈₄₇-R₈₆₃) a été prédite comme domaine potentiel d'interaction avec la centrine 2, appelée P1-XPC (Popescu et al, 2003 ; voir Figure 16). La séquence peptidique est : ⁸⁴⁷N**WKLLAKGLLIRERLKR**₈₆₃.

Le peptide P1-XPC a une très forte affinité pour la centrine 2 entière et pour son domaine C-terminal en présence de concentrations saturantes de Ca²⁺. Il a une structure très désordonnée en absence de centrine 2 et son affinité diminue mais reste significative en absence de Ca²⁺. Le domaine N-terminal, qui adopte une conformation fermée, n'apparaît pas impliqué dans l'interaction avec P1-XPC. Cette interaction peptide/protéine résulte en une structure unique, stable et très organisée.

La structure du complexe C-HsCen2/P1-XPC formé avec la partie C-terminale de la centrine 2 a été analysée par RMN (« Résonance Magnétique Nucléaire », Yang et al, 2006b). C-HsCen2 montre une structure classique de main-EF saturée en Ca²⁺, avec les deux motifs EF groupés par l'intermédiaire d'un brin β anti-parallèle (Figure 18). Ils adoptent une conformation ouverte avec les deux hélices α de chaque motif EF quasiment perpendiculaires, créant une profonde cavité hydrophobe bordée principalement de chaînes chargées négativement. Le peptide P1-XPC se replie en hélice α des résidus N1 à L9, qui est profondément enfouie dans la poche hydrophobe de C-HsCen2 et interagissant par des chaînes hydrophobes volumineuses, principalement W2 (position 848 dans la protéine entière), L5 (851) et L9 (855). La révélation de la structure cristalline de la protéine HsCen2 entière complexée au peptide P1-XPC obtenue à une résolution de 2,35 Å a permis de confirmer ces résultats (Thompson et al, 2006).

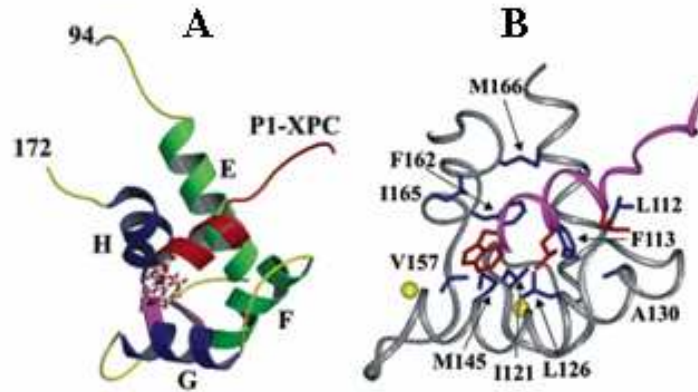


Figure 18. Structure du complexe formé par C-HsCen2 avec le peptide P1-XPC en présence de concentrations saturantes de Ca^{2+} . (A) Structure du complexe représentée avec MOLSCRIPT et Raster 3D. Les deux mains EF sont représentées en vert et bleu; le peptide est en rouge. Le résidu W2 (848 dans la protéine entière) de P1-XPC est schématisé. (B) C-HsCen2 est représentée en gris et les principaux résidus hydrophobes interagissant avec le peptide en magenta. Le peptide P1-XPC est représenté en magenta et les trois chaînes latérales des résidus W, L et L d'interaction avec la centrine en rouge. La position des ions Ca^{2+} est indiquée en jaune (D'après Yang et al, 2006).

Le motif comprenant les trois acides aminés WLL est également appelé 1-4-8 en relation avec les positions des 3 résidus hydrophobes. Ces positions sont relativement conservées chez les cibles connues de la centrine qui sont XPC, Kar1 et hSfi1 (Yang et al, 2006 ; Figure 19).



Figure 19. Séquences et motifs des peptides liant la centrine. Des résidus acides (rouges) et basiques (bleus) sont impliqués dans des interactions électrostatiques avec la protéine. Les résidus représentés en vert sont les résidus conservés en position 1-4-8 qui ancrent le peptide dans une poche hydrophobe de la centrine (D'après Yang et al, 2006).

Deux paramètres physiologiques pourraient participer à l'interaction XPC/centrine 2 : la phosphorylation et la concentration en Ca^{2+} . La centrine 2 peut être phosphorylée sur le résidu S170 (Lutz et al, 2001), mais sa phosphorylation *in vitro* ne modifie pas la structure du complexe ou l'affinité pour le peptide P1-XPC. La phosphorylation de la centrine 2 ne semble donc pas jouer de rôle important dans son interaction avec XPC. Il existe trois états

d'interaction entre C-HsCen2 et le peptide P1-XPC avec 0, 1 ou 2 Ca^{2+} liés, caractérisés par trois conformations différentes (Yang et al, 2006b). Le Ca^{2+} permet de stabiliser la structure du complexe, mais son absence n'empêche pas une interaction forte. Cette flexibilité de la centrine 2 suggère un modèle d'une grande versatilité dans la reconnaissance de ses cibles, et une réversibilité rapide lors d'évènements de signalisation calcique.

3.3. Rôle de l'interaction XPC/centrine 2 ?

3.3.1. Etude chez *S.cerevisiae*

Cdc31p interagit directement avec rad4 mais pas avec rad23 (Chen et Madura, 2008). Un mutant Δcdc31p est sensible aux UVC et l'expression de *cdc31p* dans ces mutants restaure la résistance à ces rayonnements. Cdc31p interagirait avec un complexe pré-assemblé rad4/rad23, et cette interaction serait constante tout au long du cycle cellulaire. Les auteurs suggèrent que Cdc31p pourrait promouvoir la réponse cellulaire aux dommages de l'ADN en régulant la progression du cycle cellulaire.

Chez la levure *S.cerevisiae*, il existe un nouveau facteur impliqué dans le NER appelé Rad33 (Dulk et al, 2006). Les cellules Δrad33 sont modérément sensibles aux UV et présentent une activité de NER réduite. Elles ont un niveau réduit de rad4, comme c'est le cas dans les cellules Δrad23 . Les cellules $\Delta\text{rad23}\Delta\text{rad33}$ sont hypersensibles aux UV mais le niveau de rad4 n'est pas plus réduit que dans les cellules simples Δrad23 ou Δrad33 . Ceci suggère que rad33 a un rôle additionnel dans la réponse aux UV. Rad33 lie directement rad4 mais pas rad23 (Dulk et al, 2008). Il n'existe pas de séquence homologue à rad33 chez l'homme. Mais rad33 a une structure proche de *cdc31p* et lie rad4 par la triade WLL impliquée dans l'interaction avec *cdc31*. De plus, le rôle de rad33 dans le NER est dépendant de son interaction avec rad4. Les auteurs suggèrent que le rôle de rad33 dans le complexe rad4/rad23 est similaire à celui de la centrine 2 dans le complexe XPC/Rad23B.

3.3.2. Etude chez *A.thaliana*

Le criblage génétique de lignées d'*Arabidopsis thaliana* présentant une forte activité de recombinaison homologue a été réalisé pour étudier ces mutants hyperrecombinants et une

possible balance entre voies de réparation de l'ADN. Il a ainsi été isolé un mutant présentant un défaut d'expression du gène codant pour la centrine 2 de cette espèce appelée AtCen2 (Molinier et al, 2004 ; Liang et al, 2006). La protéine AtCen2 présente 49% d'homologie avec la centrine 2 humaine et plus de 70% d'homologies dans les domaines EF. Le mutant est sensible aux UVC et il a une activité de réparation *in vitro* réduite, suggérant un lien direct entre le défaut d'expression d'AtCen2 et la diminution de l'activité du NER. Le taux d'expression d'AtCen2 est induit dès 30 minutes après une irradiation aux UVC dans des plantes sauvages et demeure stable au moins 6 heures après, impliquant AtCen2 dans un rôle précoce du NER. En outre, AtCen2 interagit directement avec AtRad4, par sa partie C-terminale et de façon dépendante du Ca^{2+} . Ce domaine est d'ailleurs suffisant pour stimuler le NER *in vitro* en association avec AtRad4.

Chez la levure et les mammifères, la réparation des crosslinks fait intervenir le NER et la RH (McHugh et al, 2001). Chez *A.thalianas*, un traitement au cisplatine induit également ces deux voies de réparation, et la surexpression d'AtCen2 abolit l'augmentation de la fréquence de RH. L'augmentation de la réparation *via* le NER peut donc inhiber la RH. Il pourrait ainsi exister un mécanisme de balance entre deux voies de réparation de l'ADN chez cette espèce de végétaux.

3.3.3. Etude chez l'homme

Une étude a été réalisée pour déterminer l'impact sur le NER des modifications des 3 acides aminés de XPC prédits pour être impliqués dans l'interaction avec la centrine 2 *in vitro* (Nishi et al, 2005). Dans les fibroblastes de patients XP-C complémentés étudiés, 5% de Rad23B et 10% de la centrine 2 sont liées à XPC. Cette stœchiométrie reste constante après une irradiation aux UVC. L'utilisation de protéines XPC tronquées a confirmé les observations structurales : la région en hélice α 'N₈₄₇-R₈₆₆ est bien nécessaire à la liaison à la centrine 2. Un peptide GST-XPC (847-866) est ainsi suffisant pour co-précipiter la centrine 2 alors que ce même peptide modifié pour les 3 acides aminés WLL appelé 3A(WLL) ne la co-précipite plus.

Une cinétique de réparation des 6,4-PP a été établie dans des fibroblastes transfectés de façon stable avec un FLAG-XPC normal ou modifié. 5 heures après une irradiation aux UVC à 10 J/m², il restait encore la totalité des 6,4-PP dans les fibroblastes non transfectés. Les fibroblastes exprimant le FLAG sauvage ont éliminé 90% et 99% des lésions 3 et 5

heures après irradiation, respectivement. Les cellules exprimant le FLAG-XPC(3A(WLL)) entraînent la réparation de 53% et 73% des lésions aux mêmes temps. Une interaction correcte entre XPC et la centrine 2 peut donc stimuler l'efficacité du NER, bien qu'elle ne soit pas essentielle à la réparation.

Des expériences de gel retard ont permis de confirmer que la centrine 2 permettait d'amplifier directement la liaison du complexe XPC/Rad23B sur l'ADN endommagé *in vitro*. En absence de centrine 2, le complexe XPC/Rad23B ou le variant 3A(WLL) présentent la même affinité pour les 6,4-PP. L'ajout d'une quantité croissante de centrine 2 induit une stimulation progressive (jusqu'à 20 fois) de la liaison du complexe sauvage à l'ADN endommagé, alors qu'il n'a aucun effet sur l'affinité du complexe muté envers la lésion. Il est intéressant de noter que la centrine 2 augmente de 4 fois l'activité de liaison du complexe sauvage à l'ADN non endommagé.

La centrine 2 n'est pas essentielle au NER *in vitro* (Araki et al, 2001), mais elle semble jouer un rôle important dans la stimulation de cette voie de réparation en augmentant l'affinité du complexe XPC/Rad23B à l'ADN endommagé par une interaction directe avec XPC. Le rôle de l'interaction entre XPC et la centrine 2 dans le NER est moins évident *in vivo*. Nishi et al. évoquent la possibilité que la centrine 2 pourrait faire le lien entre la réparation de l'ADN et la division cellulaire, et régulerait ainsi la réponse cellulaire aux dommages de l'ADN.

Objectifs de la thèse

L'objectif de ma thèse était d'étudier l'implication des protéines XPC, Rad23B et centrine 2 dans la réponse cellulaire aux UV.

Nous avons tout d'abord caractérisé plus précisément l'interaction entre XPC et la centrine 2 au niveau moléculaire et cellulaire. Nous avons ensuite déterminé l'impact de la réduction ou de l'absence de XPC sur le niveau basal et la distribution subcellulaire de la centrine 2.

Nous avons analysé la sensibilité à différents agents génotoxiques et l'efficacité de réparation d'un ADN viral irradié aux UVC de cellules présentant une réduction stable de l'expression de XPC, Rad23A et/ou Rad23B.

Nous avons également développé un outil de microirradiation laser couplée à l'imagerie confocale *in vivo* qui nous a permis d'étudier le recrutement de XPC sur des zones nucléaires endommagées dans différentes conditions.

Enfin, nous nous sommes intéressés au rôle éventuel de XPC dans l'induction de l'expression de ses partenaires après la reconnaissance des lésions de l'ADN.

Résultats

Article 1 : caractérisation moléculaire et cellulaire de l'interaction XPC/centrine 2

Présentation et résumé des résultats de l'article

La protéine XPC est impliquée dans la reconnaissance des lésions de l'ADN et dans le déclenchement du NER. Des études récentes suggèrent que la centrine 2 semblait jouer un rôle dans le NER essentiellement en interagissant avec XPC. Cette interaction a lieu par un court fragment de 17 résidus (N847-R863) situé dans la partie C-terminale de XPC. En présence de centrine 2, ce peptide appelé P17-XPC adopte une structure en hélice α exposant une triade hydrophobe (WLL : W848, L851 et L855). Ce fragment a une très forte affinité pour la partie C-terminale de la centrine 2 en présence de Ca^{2+} (10^8 M^{-1}). Les caractérisations structurale et thermodynamique approfondies réalisées dans cette étude nous ont permis de définir un motif minimal d'interaction du peptide P17-XPC avec la centrine 2. Nous nous sommes ensuite intéressés à la signification cellulaire de ces données structurales.

Les résidus W848 et L851 sont critiques pour l'interaction *in vitro*

Les 25 résidus N-terminaux de la centrine 2 ont une structure désordonnée, et peuvent induire un auto-assemblage des molécules de centrine 2 en présence de Ca^{2+} (Tourbez et al, 2004). Des cristaux de peptides P17-XPC complexés en présence de Ca^{2+} à des molécules de centrine 2 tronquée de ces 25 résidus (centrine 2 $_{\Delta\text{N}25}$) ont été obtenus. La structure du

complexe a été révélée par une méthode de remplacement moléculaire. Les cristaux, diffractant à une résolution de 1,8 Å, forment une unité asymétrique comprenant deux complexes centrine/peptide. Les deux complexes sont assemblés autour d'interactions entre les deux peptides P17-XPC. La moitié N-terminale du peptide P17-XPC est profondément enfouie dans une poche hydrophobe exposant les résidus W848, L851 et L855. La partie C-terminale du peptide, positivement chargée, présente des interactions ioniques avec la centrine 2_{ΔN25}. Par exemple, les résidus R858 et R860 sont impliqués dans un pont salin avec les acides aminés E132 et E105 de la centrine 2. Les contributions relatives des différentes parties du domaine P17-XPC dans l'interaction avec la centrine 2 ont été déterminées. Pour cela, le titrage calorimétrique isotherme (ITC, « Isothermal Titration Calorimetry ») a permis d'étudier les propriétés thermodynamiques des interactions de la centrine 2 avec différents variants du peptide. Un peptide P10-XPC (N847-L856) contenant la triade WLL produit une faible diminution de l'affinité pour la centrine 2, indiquant que les interactions électrostatiques contribuent de manière modérée à l'interaction. Différents variants du peptide P17-XPC où chaque acide aminé de la triade WLL a été substitué par une alanine ont été testés. La modification W848A ne permet plus de détecter d'interaction de XPC avec la centrine 2. La substitution L851A réduit l'interaction plus modérément alors que le variant P17-XPC(L855A) ne montre pas de diminution significative de l'affinité. Un peptide P5-XPC contenant uniquement les résidus W848 et L851 de la triade a une affinité réduite mais peut toujours lier la centrine 2, indiquant que les résidus W848 et L851 sont essentiels pour l'interaction *in vitro*.

La liaison de la centrine 2 au Ca²⁺ détermine le mode d'interaction avec XPC

La centrine 2 contient quatre sites potentiels de liaison au Ca²⁺ (main EF). Les sites III et IV de la centrine 2 sont physiologiquement actifs et le site IV a une affinité 18 fois plus importante pour le Ca²⁺ que le site III. L'affinité pour le Ca²⁺ augmente quand le peptide interagit avec la centrine 2, et la liaison du Ca²⁺ permet d'augmenter l'affinité du peptide pour la centrine 2. L'analyse des cristaux montre d'ailleurs que le résidu W848 du peptide P17-XPC est le plus proche des sites III et IV de la centrine 2. Le domaine N-terminal de la centrine 2, ne pouvant pas lier le Ca²⁺, conserve lui une conformation fermée. Les chaînes latérales sont enfouies et ne peuvent pas interagir avec des cibles potentielles telles que XPC.

La région de XPC N847-R863 possède une seconde face hydrophobe

La représentation en hélice α du fragment N847-R863 expose une deuxième triade hydrophobe composée des résidus L850, I857 et L861. Le cristal montre que ces acides aminés seraient impliqués dans des interactions hélice-hélice entre les deux peptides de l'unité asymétrique. La structure obtenue à haute résolution permet d'ailleurs de visualiser un pont salin entre la chaîne latérale du résidu E135 d'une molécule de centrine et le résidu R860 du peptide lié à la deuxième molécule de centrine. Ceci suggère que la dimérisation des peptides P17-XPC peut être renforcée par des interactions impliquant la centrine. L'analyse par RMN du complexe centrine $2_{\Delta N25}$ /P17-XPC en solution et des expériences d'ultracentrifugation à l'équilibre ont révélé une population majoritairement monomérique. Nous avons conclu que l'interaction peptide-peptide était due à un contact dans le réseau cristallin.

La surexpression de XPC induit une augmentation de la centrine 2 dans le noyau des cellules

Afin de valider ces observations moléculaires au niveau biologique, nous nous sommes intéressés à l'interaction XPC/centrine 2 dans des cellules HeLa. Nous avons tout d'abord validé des anticorps anti-XPC obtenus chez la souris. Nous avons ensuite visualisé les deux protéines dans les cellules par un marquage immunocytochimique. La centrine 2 présente un marquage homogène dans la cellule, et est détectable plus particulièrement au niveau des centrioles et de la membrane nucléaire, à la différence de XPC qui est majoritairement nucléaire. Nous avons également utilisé une fusion XPC-EGFP qui présente la même distribution que la protéine XPC endogène. Sachant que la protéine XPC est présente en quantité plus faible que ses partenaires, une augmentation de la quantité de XPC pourrait modifier la quantité ou la localisation sub-cellulaire de la centrine 2. Après transfection de ces cellules avec un plasmide portant l'ADNc de XPC ou de la protéine étiquetée XPC-EGFP, nous avons observé une forte augmentation du signal nucléaire de la centrine 2 alors que le signal cytoplasmique devient plus faible. La surexpression de XPC entraîne donc une augmentation significative de la centrine 2 dans le noyau.

La relocalisation de la centrine 2 dépend du résidu W848 de XPC

Le changement de distribution subcellulaire de la centrine 2 en fonction de la quantité de XPC nous a été utile pour confirmer le rôle crucial du W848 de XPC dans l'interaction avec la centrine 2 observé *in vitro*. Des nucléotides de l'ADNc de XPC ont été modifiés par mutagenèse dirigée, afin de substituer le tryptophane 848 en alanine et l'arginine 858 en glutamine. L'arginine 858 est impliquée dans des interactions électrostatiques avec la centrine 2. Ces deux variants de XPC présentent une localisation similaire à la protéine normale. La centrine 2 présente un fort signal nucléaire après expression de la protéine normale ou modifiée R858Q, comme précédemment. L'expression du variant W848A n'induit pas de relocalisation de la centrine 2 vers le noyau, le marquage étant équivalent aux cellules non transfectées. La re-localisation de la centrine 2 au noyau semble donc strictement dépendante de la présence de XPC. De plus, ce résultat suggère que le W848 de XPC est le résidu crucial dans l'interaction avec la centrine 2, aussi bien au niveau moléculaire que cellulaire.

Conclusion de l'article

Les analyses thermodynamiques de différents variants de XPC ont permis de déterminer un motif minimal d'interaction avec la centrine 2. Ce motif est constitué de 5 acides aminés N847-L851 incluant deux des trois résidus de la triade exposée, le W848 et la L851 ; le W848 étant le plus important. Le centre du domaine de liaison est donc constitué de la diade W848/L851. L'analyse à haute résolution (1,8 Å) du cristal a montré que le résidu du peptide P17-XPC le plus proche des sites de liaison au Ca^{2+} III et IV était le W848. L'affinité de la centrine 2 pour le peptide est d'ailleurs dépendante du Ca^{2+} , et inversement. Ces données moléculaires ont été confirmées dans un contexte cellulaire. La surexpression de XPC peut induire la re-localisation de la centrine 2 vers le noyau des cellules. Ce changement de distribution subcellulaire est dépendant de l'intégrité du résidu W848. La localisation nucléaire de la centrine 2 dépend donc de l'existence d'une interaction fonctionnelle avec XPC.

Structural, Thermodynamic, and Cellular Characterization of Human Centrin 2 Interaction with Xeroderma Pigmentosum Group C Protein

Jean-Baptiste Charbonnier^{1†}, Emilie Renaud^{2†}, Simona Miron³
 Marie H el ene Le Du¹, Yves Blouquit³, Patricia Duchambon³
 Petya Christova⁴, Alexandra Shosheva⁴, Thierry Rose⁵
 Jaime F. Angulo² and Constantin T. Craescu^{3*}

¹Laboratoire de Biologie Structurale et Radiobiologie iBiTec-S, CEA, Commissariat à l'énergie Atomique 91191 Gif-sur-Yvette, France

²Laboratoire de Génétique de la Radiosensibilité, Institut de Radiobiologie Cellulaire et Moléculaire, CEA Commissariat à l'énergie Atomique, Direction des Sciences du Vivant, B.P. 6, 92265 Fontenay aux Roses, France

³Integrative Imaging Unit INSERM U759/Institut Curie-Recherche, Centre Universitaire Paris-Sud, Bâtiment 112, 91405 Orsay, France

⁴Institut of Organic Chemistry Bulgarian Academy of Sciences 1113 Sofia, Bulgaria

⁵PFBMI, Institut Pasteur 28 rue du Dr. Roux 75724 Paris Cedex 15, France

Received 18 July 2007;
 received in revised form
 17 August 2007;
 accepted 20 August 2007
 Available online
 25 August 2007

Edited by K. Morikawa

Human centrin 2 (HsCen2), an EF-hand calcium binding protein, plays a regulatory role in the DNA damage recognition during the first steps of the nucleotide excision repair. This biological action is mediated by the binding to a short fragment (N847–R863) from the C-terminal region of xeroderma pigmentosum group C (XPC) protein. This work presents a detailed structural and energetic characterization of the HsCen2/XPC interaction. Using a truncated form of HsCen2 we obtained a high resolution (1.8 Å) X-ray structure of the complex with the peptide N847–R863 from XPC. Structural and thermodynamic analysis of the interface revealed the existence of both electrostatic and apolar inter-molecular interactions, but the binding energy is mainly determined by the burial of apolar bulky side-chains into the hydrophobic pocket of the HsCen2 C-terminal domain. Binding studies with various peptide variants showed that XPC residues W848 and L851 constitute the critical anchoring side-chains. This enabled us to define a minimal centrin binding peptide variant of five residues, which accounts for about 75% of the total free energy of interaction between the two proteins. Immunofluorescence imaging in HeLa cells demonstrated that HsCen2 binding to the integral XPC protein may be observed in living cells, and is determined by the same interface residues identified in the X-ray structure of the complex. Overexpression of XPC perturbs the cellular distribution of HsCen2, by inducing a translocation of centrin molecules from the cytoplasm to the nucleus. The present data confirm that the *in vitro* structural features of the centrin/XPC peptide complex are highly relevant to the cellular context.

  2007 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Keywords: XPC; NER; human centrin 2; protein interactions

*Corresponding author. E-mail address: Gil.Craescu@curie.u-psud.fr.

†J.-B.C. and E.R. contributed equally to this work.

Abbreviations used: MTOC, microtubule organizing center; HsCen2, human centrin 2; C-HsCen2, the C-terminal half of HsCen2; ITC, isothermal titration calorimetry; NER, nucleotide excision repair; XPC, xeroderma pigmentosum group C protein; CaM, calmodulin;  N25-HsCen2, human centrin 2 deleted of the first 25 N-terminal residues; P17-XPC, P10-XPC, P5-XPC, centrin binding peptides from XPC with the sequence N847–R863, N847–L856 and N847–L851, respectively.

Introduction

Centrins are small acidic proteins, highly conserved in eukaryotes from yeast to human.^{1,2} They belong to the large calmodulin (CaM) super-family, whose members share the common property to bind Ca^{2+} with high affinity (10^5 – 10^8 M^{-1}) through a highly specialized structural motif called EF-hand. Centrins are generally found in the microtubule organizing centers (MTOC), cytoplasmic eukaryotic organelles involved in the nucleation of the microtubules and in the control of their spatial and temporal organization. MTOCs exhibit various morphological and functional properties from species to species and are called centrosomes in mammalian cells, basal bodies in ciliated and flagellate cells and spindle pole bodies in yeasts. Centrin function is particularly important for the duplication of the MTOCs, that takes place prior to cell mitosis.^{3–5} However, it was found that only 10% of the total centrin is localized in MTOCs, the other fractions being distributed, in a more diffuse manner, in other organelles or cell compartments.⁶ The various localizations of the protein may be associated with different functional roles, as it is the case of the nuclear fraction, recently shown to be implicated in the DNA nucleotide excision repair pathway (NER).^{7,8}

NER is a major pathway for recognition and removal of bulky DNA lesions such as the UV-induced photoproducts or carcinogenic adducts. Its dysfunction is associated with severe disorders in humans, including xeroderma pigmentosum, a hereditary disease characterized by a high photosensitivity and a 1000-fold increase of sunlight-induced skin cancers.⁹ The NER is composed of two sub-pathways: (1) the transcription coupled repair which eliminates DNA adducts that block transcription, and is initiated by the RNA polymerase; and (2) the global genome repair (GG-NER) which operates all over the genome and is initiated by a complex including xeroderma pigmentosum group C protein (XPC), human centrin 2 (HsCen2), and RAD23B.^{7,10} This heterotrimer plays a key role in the initial phase of DNA-damage recognition and in the recruitment of other repair factors, including TFIIH.^{7,11–14} The presence of HsCen2 in this complex was revealed by a careful analysis of XPC/RAD23B samples purified from HeLa nuclear extracts.⁷ The centrin molecules interact physically with XPC⁷ and plays a direct stimulatory role in the NER process, by enhancing the specificity of the XPC/RAD23B complex for DNA lesions.¹⁴ Studies using *Arabidopsis thaliana* centrin 2^{8,15} confirmed and extended the hypothesis of a centrin functional role in the repair process, suggesting the existence of a common regulatory mechanism throughout the eukaryotic kingdom.

The molecular interaction between HsCen2 and XPC is mediated by a high affinity centrin binding site located between amino acid residues N847 and R863 in the C-terminal part of XPC.¹⁶ The 17-mer peptide corresponding to this sequence (P17-XPC) shows a high affinity for HsCen2 in the presence of

the Ca^{2+} ($\sim 10^8 \text{ M}^{-1}$), which decreases 20-fold in the absence of the divalent cation, and involves only the C-terminal half of HsCen2 (C-HsCen2).¹⁶ We previously reported the solution structure of the complex between C-HsCen2 and the peptide P17-XPC in the presence of Ca^{2+} .¹⁷ The bound peptide adopts a helical structure and exhibits a hydrophobic triad (WLL: W848, L851 and L855) on one face of the helix. These data were recently confirmed by a crystal structure at 2.35 Å resolution of the full-length HsCen2 in complex with the P17-XPC peptide.¹⁸

Here we report an in-depth molecular and thermodynamic characterization of the HsCen2/XPC interaction. A truncated form of HsCen2, which lacks the unstructured first 25 residues ($\Delta\text{N}25$ -HsCen2) and binds strongly P17-XPC, allowed us to obtain crystals of the complex that diffract up to 1.8 Å. The high-resolution structure (1.8 Å) revealed new features of the HsCen2/P17-XPC interaction, and suggested a structural basis for the interdependence between P17-XPC and Ca^{2+} binding to HsCen2. Calorimetric investigation of the molecular interaction, using target peptides of variable length and sequence, emphasized the contribution of the three side-chains of the hydrophobic triad, defining a minimal (five residue) centrin binding motif. In order to assess the biological relevance of the molecular data, we analyzed *in vivo* the localization of HsCen2 in human cells expressing XPC or mutants using immunofluorescence. Overexpression of XPC in HeLa cells induces a translocation of a significant part of the cytoplasmic HsCen2 to the nucleus, and this effect is dependent on the integrity of the XPC centrin binding motif.

Results

High-resolution structure of $\Delta\text{N}25$ -HsCen2/P17-XPC complex reveals atomic details of the interaction

HsCen2 molecules are highly flexible due to the uncorrelated movements of the two domains, and to the long N-terminal string (25 residues) lacking any regular secondary or tertiary structure.^{17,19} In addition, the N-terminal extension was shown to induce formation of heterogeneous Ca^{2+} -dependent self-assemblies.²⁰ Reducing the molecular disorder, by the deletion of the first 25 residues ($\Delta\text{N}25$ -HsCen2), enabled us to obtain well-diffracting crystals of the complex formed by the truncated centrin and the peptide P17-XPC (N847–R863) (Figure 1), in the presence of CaCl_2 .²¹ Crystals diffracting up to 1.8 Å resolution have been obtained in MPEG 550 and bicine buffer (pH 9.0) (Table 1). Recently, a structure of the full-length HsCen2 bound to the same peptide was reported by Thompson *et al.*¹⁸ at 2.35 Å resolution. The crystallization conditions used for the latter structure were different, with $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ used as precipitant, and

P17-XPC (847-863) **NWKLAKGLLIRERLKR**
P17-XPC (W848A) **NAKLLAKGLLIRERLKR**
P17-XPC (K849E) **NWELLAKGLLIRERLKR**
P17-XPC (L851A) **NWKLAKGLLIRERLKR**
P17-XPC (L855A) **NWKLAKGALIRERLKR**
P10-XPC (847-856) **NWKLAKGLL**
P5-XPC (847-851) **NWKL**

Figure 1. Sequences of the peptides mentioned in the present work. The peptide used in the crystal structure is P17-XPC and corresponds to the XPC sequence N848–R863. The color code is the following: green, anchoring residues; red, acidic residues; blue, basic residues; magenta, residues substituted in order to dissect the contribution of different positions to the interaction with HsCen2.

phosphate buffer (pH 7.0). Surprisingly, the crystal lattices obtained in both studies are close, with two centrin/peptide complexes in the asymmetric unit (Figure 2(a)). In both cases the two complexes observed in the asymmetric unit form an asymmetric dimer through the interaction between the XPC peptides. The two centrin/peptide complexes observed here superpose well individually to the two complexes reported previously (rmsd between 0.44 Å and 0.51 Å over 621 main-chain atoms).

As the 25 first amino acids of HsCen2 are disordered in the 2.35 Å structure, we suggest that removal of this region in our construct improved significantly the quality of the crystals and reduced more than 2.5 times the average *B* factors of the protein/peptide backbone atoms (Figure 3(a)). The structure quality is also reflected in the Ramachandran analysis with 95.5% of the dimmer residues in the most favored Φ/Ψ regions (Figure 3(b)). The four C-terminal residues of HsCen2 were found previously to be disordered, except for the last residue (Y172) which was tentatively located close to the peptide.¹⁸ This region includes Ser170, a residue which seems to be biologically relevant, as a cell cycle dependent phosphorylation site.²² In our higher resolution structure, no electron density was observed for the last four C-terminal residues or in the vicinity of the peptide, suggesting that the C-terminal end is highly flexible, in complete agreement with previous NMR studies.^{17,23}

Only the C-terminal domain of centrin contributes to the binding (Figure 2(b)), in contrast with many CaM/peptide complexes where two domains wrap around the target α -helix.²⁴ In the complex, P17-XPC peptide and HsCen2 bury 910 Å² and 719 Å² of their solvent-accessible surface area, respectively. The N-terminal half of the peptide (N847–L856) contributes for 82% of the P17-XPC buried surface. In this part of the peptide, the hydrophobic triad W848, L851 and L855 appear to be the major anchoring determinant^{14,17,18} (Figure 2(b)). The C-terminal end of P17-XPC, which is highly positively charged (four basic and only one acidic residues), shows ionic interactions with centrin. The guanidinium group of R858 and R860 are involved

in salt bridges with centrin E132 and E105 side-chains, respectively. The R860/E105 ionic interaction, which was not observed at lower resolution, may shed some light on *Chlamydomonas reinhardtii*²⁵ or yeast²⁶ phenotypes caused by the substitution of the Glu residue in the centrin of these organisms. The two basic amino acids in XPC are well conserved (59% and 80% of R or K in positions 858 and 860, respectively, over 51 XPC eukaryote sequences). In contrast with the open structure observed for the C-terminal domain of Δ N25-HsCen2, the N-terminal domain keeps a closed conformation and shows no contacts with the other protein half or the peptide. The N-domain structure is very similar in the two independent crystallographic complexes with an rmsd of 0.31 Å for the best backbone superposition of secondary structure elements.

XPC hydrophobic residues W848 and L851 are critical for centrin binding

To assess the role of the N-terminal and C-terminal halves of P17-XPC and the role of each residue of the hydrophobic triad WLL, we analyzed by isothermal titration calorimetry (ITC) the thermodynamic properties of the interaction between HsCen2 and XPC peptide variants of different size and sequence (Figure 1; Table 2). Our reference interaction is the high-affinity ($K_a = 1.7 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$)

Table 1. Data collection and refinement statistics

A. Data collection	
Space group	C2
Unit-cell dimension (Å)	$a = 60.27, b = 59.42,$ $c = 105.14, \beta = 94.7^\circ$
Resolution range (Å)	52.4–1.8 (1.9–1.8)
No. observations	199, 958
No. of unique reflections	34, 221
R_{sym} (%) ^a	7.8 (39.5)
Completeness (%)	99.3 (95.5)
$\langle I \rangle / \langle \sigma(I) \rangle$	6.4 (1.8)
B. Refinement	
No. of amino acids in centrin ^{2b}	286
No. of amino acids in P17-XPC ^c	33
No. of Ca ²⁺	4
No. of water molecules	384
Total no. of atoms in final model	2983
Resolution range (Å)	20.0–1.8
R -factor/ R_{free} ^d	20.1/26.5
Root-mean-square deviation from ideal	
Bonds (Å), Angles (°)	0.014, 1.4
Ramachandran	
(% amino acid in most favored regions)	95.5
Average B -factors (Å ²)	
Centrin-2, P17-XPC, Ca ²⁺ , Solvent	19.5, 21.9, 13.9, 31.9

^a $R_{\text{sym}} = \sum |I_h - \langle I_h \rangle| / \sum I_h$, where I_h is the mean of the measurements for a single hkl .

^b Residues included in final model: amino acids T26–K168 for both molecules of centrin 2.

^c Residues included in final model: amino acids N847–K862 for first molecule of P17-XPC, amino acids N847–R863 for second molecule of P17-XPC. The acetyl modification of peptide in N-term is observed and the corresponding atoms have been refined.

^d $R_{\text{factor}} = \sum |F_{\text{obs}} - F_{\text{calc}}| / \sum F_{\text{obs}}$, where I_h is the mean of the measurements for a single hkl .

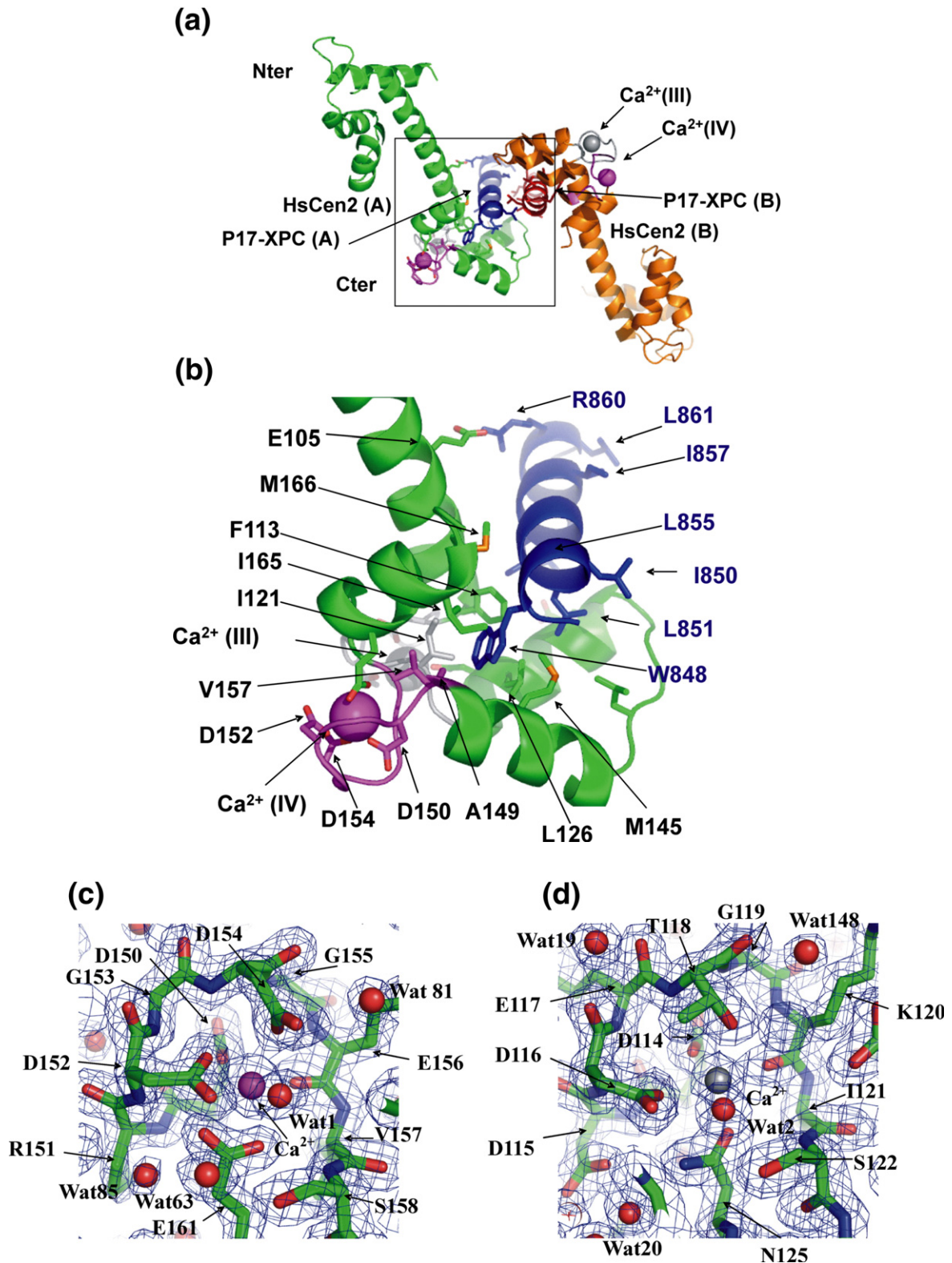


Figure 2. Crystal structure of the complex Δ N25-HsCen2/P17-XPC. (a) Global view of the two Δ N25-HsCen2/P17-XPC complexes observed in the asymmetric unit. The centrin molecules are represented in green and orange ribbons. The two bound P17-XPC peptides are shown in dark blue and red ribbons. The calcium ions present in the C-terminal binding sites of centrin molecules are represented as magenta (site IV) and grey (site III) balls. (b) Zoom of the centrin/peptide interaction and position of this interface relative to the Ca^{2+} binding sites. The orientation of the complexes in (a) and (b) is the same. (c) and (d) Electron density maps around the Ca^{2+} binding sites IV (c) and III (d). $2F_o - F_c$ maps contoured at 2σ are represented.

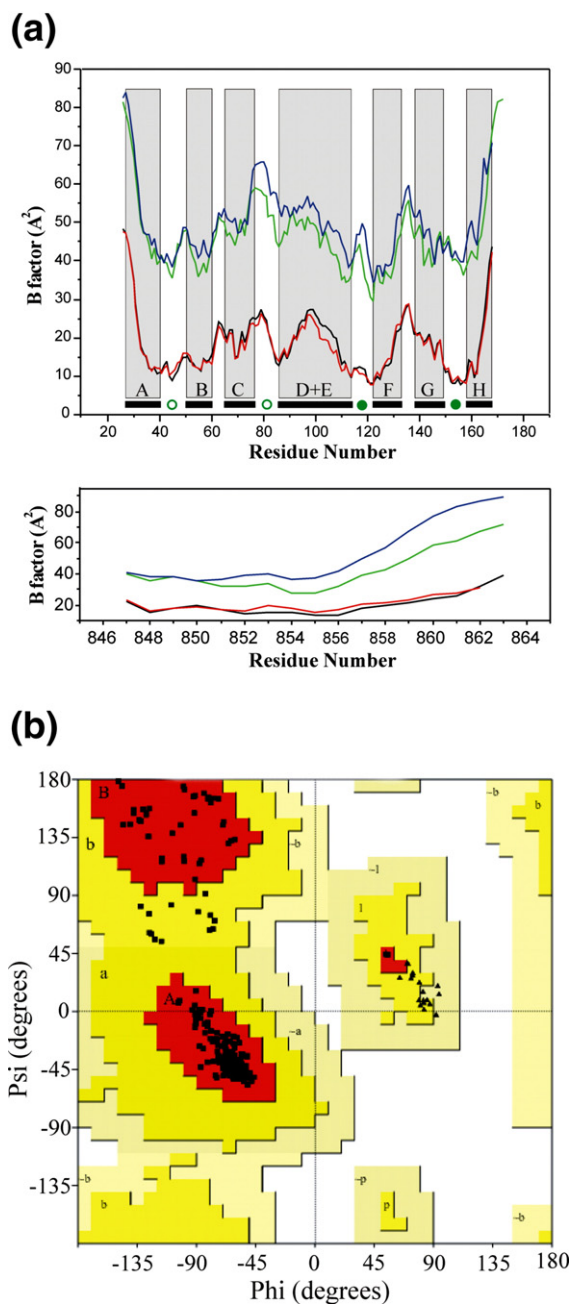


Figure 3. (a) The B factors of the centrin and peptide C^α atoms in the complex $\Delta N25$ -HsCen2/P17-XPC, plotted against the residue number. Data for the two centrin and two peptide molecules in the crystallographic asymmetric unit (black and red) are compared with the corresponding factors in the structure by Thompson *et al.*¹⁸ (blue and green). The helical fragments in the protein are indicated by the shaded areas. The empty and filled green circles indicate the free and bound Ca^{2+} sites, respectively. (b) The Ramachandran plot of the complex dimer; 95.5% and 4.5% of the residues were found in the most favored and additional allowed regions, respectively.

binding of P17-XPC to the full-length HsCen2 in the presence of Ca^{2+} (Figure 4(a)). This interaction is enthalpy-driven and presents an unfavorable entropic term. The unfavorable entropic term may

correspond to the penalty associated with the structural transition of the peptide from random-coil to helix upon HsCen2 binding.¹⁶ The thermodynamic parameters obtained with the full-length HsCen2 and C-HsCen2 are very similar, in agreement with the absence of interaction between the N-terminal domain and the peptide.

A shorter 10-mer peptide (P10-XPC: N847–L856) was designed (Figure 1) in order to evaluate the binding contribution of the C-terminal half of P17-XPC containing five charged side-chains. Surprisingly, P10-XPC shows only a threefold decreased affinity for HsCen2 relative to P17-XPC in the same solution conditions (Table 2), suggesting that the electrostatic interactions involving the C-terminal part of the peptide contribute moderately (about 7%) to the free energy of binding. This conclusion is in good agreement with (i) the progressive increase of the peptide backbone B factors observed after position L855 (Figure 3(a)), and (ii) with our previous NMR work, where significant intra- and inter-molecular interactions were observed only for the first nine peptide residues.¹⁷ Thus, the main interacting region of XPC with HsCen2 corresponds to a 10-mer motif, which contains the three hydrophobic anchoring residues W848, L851 and L855.

To evaluate the individual contribution of W848, L851 and L855 residues to centrin binding, we analyzed P17-XPC variants in which each of the three anchoring residues were substituted by alanine. W848A substitution decreases the binding affinity under the detection limit of the method,¹⁷ highlighting the critical role of the Trp moiety. This is in good agreement with the present structure of the complex showing that W848 is deeply buried in HsCen2 and contributes to 25% of the whole buried surface of the P17-XPC peptide (228 Å² over 910 Å²). The substitution L851A has a less dramatic effect, decreasing the binding affinity by a factor of 15 ($\Delta\Delta G$ value of +1.6 kcal/mol) (Figure 4(a); Table 2). Surprisingly, substitution of the third anchoring residue (L855A) has no significant effect on the binding affinity. The calorimetric analysis allows for a better understanding of the energetic basis of these observations. Both variants L851A and L855A, show a large unfavorable change in enthalpy ($\Delta\Delta H$ value of +8.2 and +6.5 kcal/mol, respectively) and a large favorable entropy change ($\Delta(T\Delta S)$ of +6.6 and +6.4 kcal/mol, respectively), but their binding is still enthalpy-driven (Figure 4(c)). The favorable entropy change may originate from the smaller conformational entropy change of Ala *versus* Leu side-chain upon binding, or from the increased helical propensity of the peptide. For L855A, enthalpy and entropy variations compensate each other, resulting in an unchanged free energy of binding (Table 2). In the case of L851A, the unfavorable change of ΔH overcomes the favorable variation of $T\Delta S$, resulting in a 15-times lower affinity.

Analysis of these two peptide variants emphasizes the importance of a detailed thermodynamic dissection of the peptide binding experiments. Ala

Table 2. Thermodynamic data of HsCen2 interaction with XPC-derived peptides

Protein	Ca ²⁺ (mM)	Peptide	K _a (10 ⁶ M ⁻¹)	K _a (ref)/K _a	ΔG (kcal/mol)	ΔH (kcal/mol)	TΔS (kcal/mol)
HsCen2	2	P17-XPC	170(30)	1	-11.4	-26.6(0.2)	-15.2
HsCen2	0 ^a	P17-XPC	8(1)	21	-9.6	-35.8(0.6)	-26.2
C-HsCen2 ^b	2	P17-XPC	120(50)	1.4	-11.2	-29.1(0.1)	-17.9
HsCen2 ^c	2	P17-XPC(K849E)	92(3)	2	-11.1	-30.2(0.2)	-19.1
HsCen2 ^c	2	P17-XPC(W848A)	<0.01	>10 ⁴			
HsCen2	2	P17-XPC(L851A)	11(1)	15	-9.8	-18.4(0.1)	-8.6
HsCen2	2	P17-XPC(L855A)	132(20)	1.3	-11.3	-20.1(0.1)	-8.8
Δ25N-HsCen2	2	P10-XPC	40(5)	4	-10.6	-28.9(0.2)	-18.3
HsCen2	2	P10-XPC	51(6)	3	-10.7	-24.5(0.1)	-13.8
HsCen2	0*	P10-XPC	0.4(0.02)	425	-7.8	-26.3(0.4)	-18.5
HsCen2	2	P5-XPC	0.25(0.05)	680	-7.5	-2.0(0.3)	+5.5
Δ25N-HsCen2	2	P5-XPC	0.20(0.07)	850	-7.4	-2.4(0.4)	+5.0

Results of ITC experiments conducted at 30 °C in Mops 50 mM buffer (pH 7.4), NaCl 100 mM in the presence (2 mM CaCl₂) or the absence (5 mM EDTA) of Ca²⁺. The stoichiometry of the reactions was always close to 1. The standard deviations of the fitted parameters are given in parenthesis.

^a EDTA 5 mM.

^b From Popescu *et al.*¹⁶

^c From Yang *et al.*¹⁷

substitution, often used to assess the binding contribution of different side-chains, may systematically produce a favorable entropic contribution to the free energy of binding, either by reducing the side-chain entropy variation upon binding or by increasing the peptide helical propensity. Consequently, the simple determination of the binding constant (the free energy of binding) in Ala scanning series may misestimate the energetic role of the substituted side-chain.

The significant affinity of P10-XPC for HsCen2 ($K_a = 5.1 \times 10^7$ M⁻¹) prompted us to search for a smaller XPC motif, which still binds HsCen2. A short binding peptide could provide a useful lead compound for the future design and development of inhibitors of the HsCen2/XPC interaction. Given the reduced contribution of L855, we tested a five residue long peptide (P5-XPC), including residues N847–L851 (Figure 1). The peptide still binds HsCen2 with a three orders of magnitude lower affinity ($K_a = 2.5 \times 10^5$ M⁻¹), and shows dramatically changed energetic terms (Figure 4). The entropy term becomes favorable, likely due to the decrease of the conformational cost associated with the reduced size of the peptide. The decreased affinity of P5-XPC is determined by the large decrease in enthalpy which may correspond to a destabilized helical structure of the bound peptide due to its reduced size, and to the loss of interactions contributed by 12 residues A852 to R863 which represent 43% of the whole area buried by the 17-mer peptide (Figure 4).

High and low affinity centrin calcium sites determine XPC binding mode

The present high-resolution structure uncovers several new features of the Ca²⁺ binding to HsCen2, and of the Ca²⁺ regulatory role on the HsCen2/XPC interaction. Previous studies have shown that among the four putative Ca²⁺ binding sites present in HsCen2, only two are physiologically significant, both situated in the C-terminal domain.^{23,27} Site IV (D150–E161) has an 18-fold higher affinity than site

III (D114–N125) in KCl salt. The cation affinity of both sites is enhanced when a target peptide is bound on the exposed hydrophobic surface.^{23,27} As revealed by NMR Ca²⁺ titration,¹⁹ the N-terminal domain of HsCen2 has a very low affinity site for calcium ($K_a \sim 10^2$ M⁻¹), located in EF-hand I. The present high-resolution structure enables us to rationalize these functional observations.

In agreement with the observed relative affinities, the C-terminal calcium sites in EF-hand III and IV were refined with occupancy of 0.7 and 1.0, respectively, and a B factor close to those of surrounding protein atoms. In site IV, which possesses a canonical loop sequence,²⁸ the Ca²⁺ is liganded by six oxygen atoms belonging to the side-chains (D150, D152, D154, E161) or the backbone (E156) of the protein, and by a seventh oxygen from a water molecule, which in turn is hydrogen-bonded to a side-chain oxygen from D154 (Figures 2(c) and 5(b)). The ligand distances (Ca–O) are well within the range observed for other EF-hand proteins, with an average of 2.5 Å.²⁸ Interestingly, the closest residue of XPC peptide to EF-hand IV is W848, the critical anchoring residue of the interface, with the shortest distance Ca²⁺–W848 = 9.6 Å. This tryptophan residue is in contact with V157, a pivotal residue from the β-sheet linking the two EF-hands, and with A149 situated prior to the IVth binding loop sequence (Figure 2(b)).

The IIIrd binding loop presents an unusual asparagine residue (N125) in place of the consensus bidentate Glu residue in position 12 of the EF-hand motif. The Ca²⁺ (refined with an occupancy of 0.7) is liganded by five oxygen atoms belonging to the side-chains (D114, D116, T118 and N125) or the backbone (K120) of the protein and by a sixth oxygen from a water molecule, which in turn is hydrogen-bonded to a side-chain oxygen from D116. The metal ion is thus bound to six ligands, instead of seven ligands for site IV, due to the Asn for Glu substitution in position 12 (Figures 2(d) and 5(a)). The reduced coordination of the Ca²⁺ in site III explains the lower affinity of this site²⁷ and the

enhanced dynamics of the loop backbone in the corresponding EF-hand motif.^{17,29} The closest residue of XPC to the Ca^{2+} in site III is again W848 with the shortest distance Ca^{2+} -W848=10.2 Å. Residue W848 is now in contact with I121, the counterpart of V157 on the other β -strand (Figure 2(b)).

No electron density was observed at high resolution in the two binding loops of the N-terminal domain, consistent with the low affinity of these sites.¹⁹ In the absence of a bound metal ion, the two loops are more open relative to the sites III and IV, the conformational difference being larger in the second half of each loop (Figure 5(c) and (d)). Consequently, the N-domain assumes a closed conformation, with buried hydrophobic side-chains. Lack of an exposed hydrophobic patch, which is the usual target binding site in EF-hand proteins, explains the fact that the N-terminal domain of HsCen2 has no contribution to the XPC binding. This feature clearly distinguishes the binding mode of centrin from that generally observed for calmodulin, in which the two lobes participate to the target binding.³⁰

XPC region N847–R863 possesses a second hydrophobic face buried in the crystal packing

A helical wheel representation of XPC region N847–R863 shows two hydrophobic surfaces. One consists of the triad W848, L851 and L855 that defines most of the interaction surface with HsCen2. The other consists of L850, I857 and L861 residues. What is the role of this second interface in the context of the integral XPC protein? The crystal packing of the present structure suggests that this second face may be involved in helix–helix interactions (Figure 2(a)). The interface between the two peptides is asymmetric though it involves the same amino acids L850, I857 and L861 from each P17-XPC peptide. The total accessible surface buried by the two peptides is 660 Å² (compared to the 1630 Å² area buried between the peptide and centrin). The helix packing is reminiscent of coiled-coil interactions but the hydrophobic positions in the peptide sequence are not distributed as commonly observed in coiled-coil patterns.³¹ In the high-resolution structure, a salt bridge is clearly visible between E135 side-chain of one centrin molecule and R860 from the peptide bound to the second centrin. This ionic interaction suggests that the peptide dimer may be reinforced by interactions mediated by the centrin molecules.

In the previous crystallographic study on the HsCen2/XPC complex¹⁸ the question was raised whether the interface between XPC peptides was due to a crystal packing or corresponded to a dimerization propensity of this region. To address this question we investigated the oligomerization state of the complex $\Delta\text{N25-HsCen2/P17-XPC}$ in solution using biophysical methods. NMR spectra of the complex obtained at 200 mM NaCl exhibit a spectral linewidth compatible with a major monomeric population.¹⁷ ITC dilution experiments also

failed to show any evidence for the oligomerization of P17-XPC alone (not shown). Finally, analytical ultracentrifugation at equilibrium reveals that $\Delta\text{N25-HsCen2/P17-XPC}$ complex is essentially monomeric at 2 mg/ml and 10 mg/ml (Figure 6). Taken together, these observations strongly suggest that the peptide–peptide interaction in the crystal may correspond to a crystal contact. This is also consistent with the value of the buried area observed between the two XPC peptides in the crystal, which is in the range of mean values reported for crystal contacts area (570 Å²).³² In the cellular context, the second hydrophobic surface of P17-XPC may be involved in different interactions, either with other XPC regions or with other targets like TFIIH subunits, which were shown to bind the C-terminal region of XPC.^{33,34}

XPC induces HsCen2 translocation from the cytoplasm to the nucleus

The HsCen2–XPC interaction studied in cell lysates or reconstituted repair systems¹⁴ confirmed the centrin binding site of XPC, predicted by biophysical studies.¹⁶ However, there is no experimental data on the particularities and consequences of this interaction in living cells. In order to assess the cellular aspects, and to validate the molecular and structural observations, we investigated the HsCen2–XPC interaction in cultured HeLa cells, using molecular imaging and antibodies directed against the two proteins. The quality of the anti-XPC3 antibodies generated in our laboratory was tested by Western blot on several cell extracts derived from XPC patients, on HeLa cells, as well as on XP44RO_C and XP14BR_C primary fibroblasts complemented with a retrovirus carrying XPC cDNA. The amounts of studied proteins in the analyzed extracts are similar to that of α -tubulin (data not shown).

Detection of XPC or XPC-EGFP in HeLa cells, using anti-XPC3 antibodies and the fluorescence of the fusion protein, respectively, showed a homogeneous nuclear distribution as reported^{35,36} (data not shown). Under similar conditions, the polyclonal and the monoclonal anti-HsCen2 produced a strong peri-nuclear staining and a weak disperse fluorescence signal in the cytoplasm and the nucleoplasm in agreement with previous reports (data not shown).^{6,37}

In physiological conditions, the amount of cellular XPC is significantly lower relative to other proteins like RAD23B³⁸ or HsCen2.¹⁴ It is likely that a significantly increased amount of nuclear XPC may modify *in vivo* the sub-cellular localization of HsCen2. In order to test this hypothesis, the cDNA of XPC or of XPC-EGFP construct were transfected into HeLa cells, and the expressed proteins were visualized 48 h after transfection by immunocytochemistry or direct fluorescence, respectively. The fluorescence sensitivity was tuned to allow observation of the most fluorescent cells. Under these conditions the signal produced by the endogenous

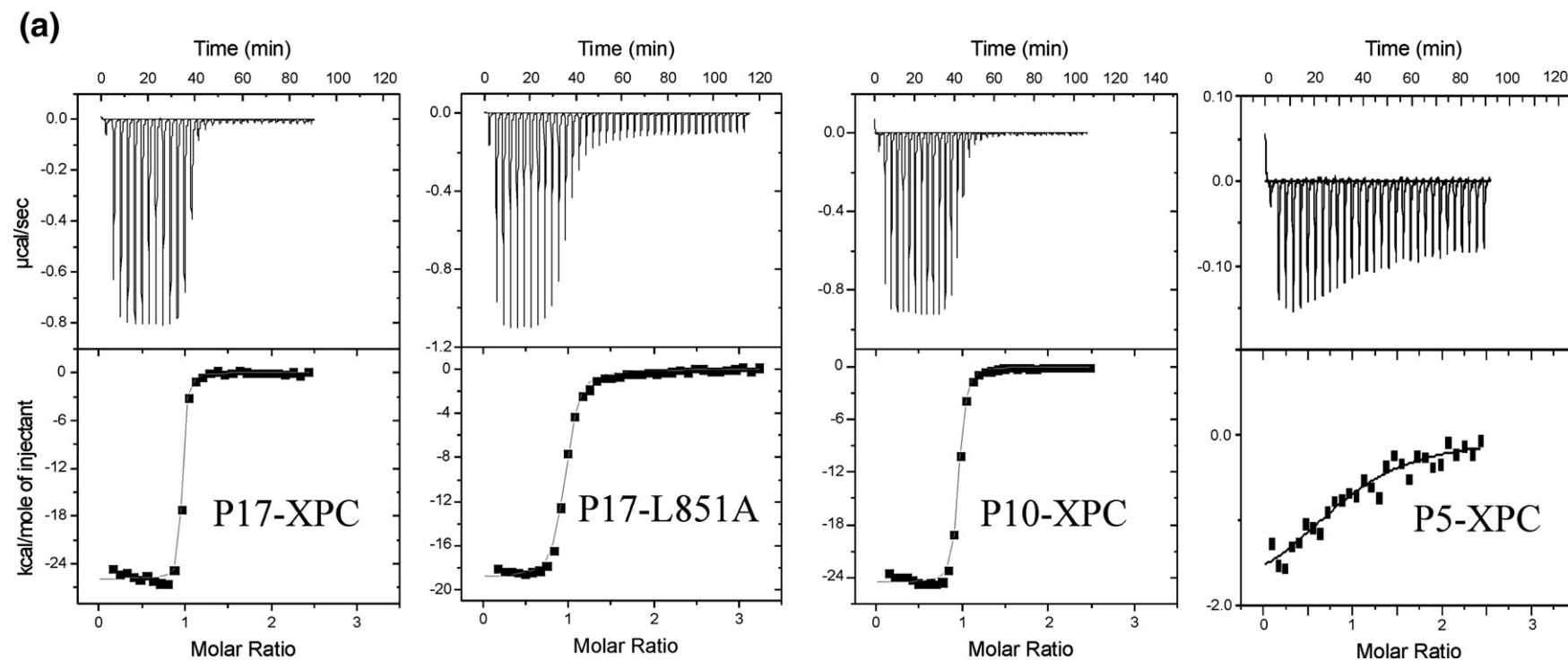


Figure 4. Thermodynamic analysis of the binding of XPC-derived peptides to HsCen2. (a) Raw ITC data (upper panel) and thermograms (lower panel) of the HsCen2 titrations by various peptides. (b) A simplified representation of the intermolecular contacts between XPC (red ribbon) and HsCen2 (blue contour). The electrostatic interactions are represented by the contribution of residue R858 and R860 from XPC. (c) Enthalpic (blue) and entropic (green) contributions to the free energy of interaction (red) between various peptide variants and HsCen2 at 30 °C. The arrows connect the energy profile to the corresponding structural intermolecular contact.

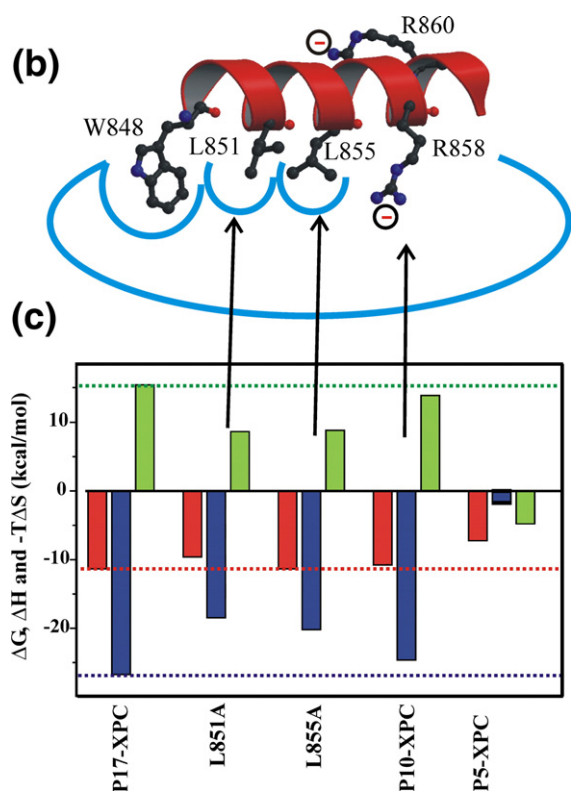


Figure 4 (legend on previous page)

XPC protein in non-transfected cells was under the detection threshold (Figure 7, left panels). Transfection of EGFP or HsOGG1-EGFP (a nuclear protein involved in base excision repair) cDNA was used as control. The sub-cellular distribution of HsCen2 does not change after expression of EGFP or HsOGG1-EGFP, while overexpression of XPC or XPC-EGFP significantly modifies the HsCen2 staining pattern (Figure 7). The overall intra-nuclear immunofluorescence signal clearly increases and shows bright speckles, whereas peri-nuclear signal decreases. These results show that an increase in the nuclear XPC concentration leads to the translocation of significant amounts of HsCen2 into the nucleus, perturbing the normal cellular distribution of this regulatory protein.

Re-localization of HsCen2 critically depends on the hydrophobic residue W848

The nuclear recruitment of HsCen2 by XPC provides an efficient experimental approach to assess whether the structural features of the HsCen2/P17-XPC complex observed *in vitro* govern also the cellular interaction of the two integral proteins. Two amino acids in XPC were individually substituted: W848, shown *in vitro* to be critical for the interaction, and R858 which has a much smaller contribution to the binding energy (Figure 4). The intracellular interactions of the two substituted XPC constructs (W848A and R858Q) were monitored by the procedure presented in the previous section. The

fusion protein variants, named XPC-(W848A)-EGFP and XPC-(R858Q)-EGFP, are well expressed and localize in the nucleus with a pattern very similar to that of wild-type XPC (Figures 8). The cells expressing the XPC variant W848A displayed an HsCen2 staining pattern very similar to that of non-transfected cells, strongly suggesting that the point mutation precludes HsCen2/XPC interaction in HeLa cells. In contrast, the R858Q variant did not produce significant changes in the cellular HsCen2 distribution, in agreement with the minor role played by R858 in the complex formation. Fractionation of transformed cells shows that the XPC variants maintain a very similar nuclear distribution pattern and are expressed in similar amounts (data not shown). These observations confirm that the XPC-driven re-localization of HsCen2 in the nucleoplasm is mediated by the same physical interactions observed *in vitro*, and emphasize the critical role of the residue W848.

Discussion

HsCen2 affinity for XPC peptide is Ca^{2+} -dependent and reciprocally

The present 1.8 Å resolution structure shows a higher occupancy for Ca^{2+} cations in site IV relative to site III (1.0 versus 0.7) and the proximity of both cations to the XPC peptide position W848. The free energy of Ca^{2+} binding to HsCen2 is partially used to compensate the EF-hand domain opening and the unfavorable exposure of a large hydrophobic surface. The target peptide hides a large part of this surface, and stabilizes the open conformation, resulting in a significant increase of the Ca^{2+} affinity.²⁷ The contacts between the peptide anchoring side-chains and some protein residues from the ion binding region (mainly of the β -scaffold) may also favor the Ca^{2+} binding by lowering the internal dynamics of the binding loops. In contrast with most of the EF-hand domains, the free and calcium bound C-terminal domain of HsCen2 is highly fluctuating in solution, being in dynamic equilibrium between open and closed conformations,²³ and this may explain the significant affinity for P17-XPC in the apo state. Binding of the target peptide stabilizes the open structure and decreases the internal fluctuations,¹⁷ resulting in a more favorable entropic term for the Ca^{2+} binding.

Symmetrically, the calorimetric experiments showed that P17-XPC binding energy is enhanced by about 2 kcal/mol in the presence of Ca^{2+} (Table 2). The di-cation binding partially neutralizes the negative charges of the binding loop and constrains the EF-hand domain toward an open conformation, thus uncovering the XPC binding pocket.

Target peptide binding to centrin is mainly directed by a Trp and Leu dyad

The thermodynamic analysis of XPC peptide variants presented here highlights the relative

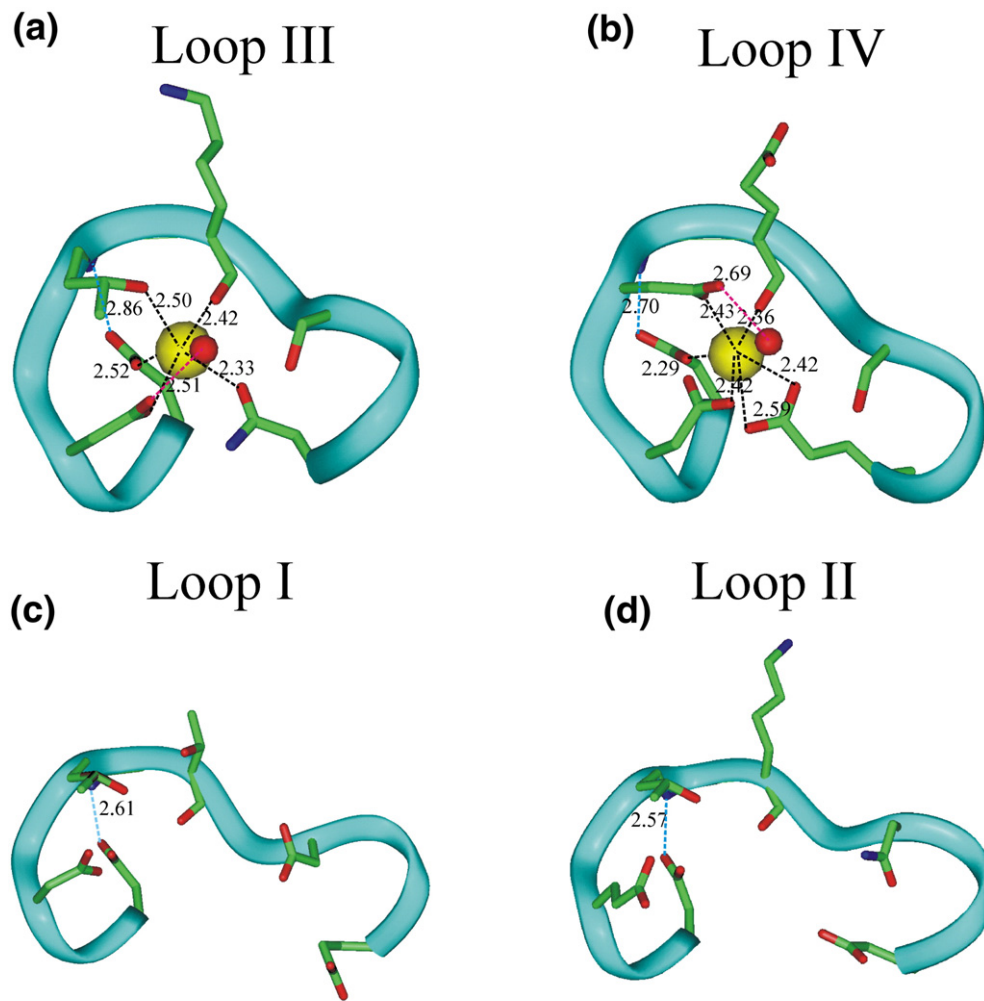


Figure 5. Structural characteristics of the Ca^{2+} binding sites in HsCen2. The calcium-bound loops III (a) and IV (b), and the calcium-free I (c) and II (d) loops in $\Delta\text{N25-HsCen2/P17-XPC}$ complex are shown in a similar orientation. The main-chain of the binding loops are shown in ribbon and the side-chains potentially providing ligands for the ion are shown as sticks. The coordination bonds (Ca–O), intra-loop hydrogen bond (D¹–G⁶) and water hydrogen bonds are shown by interrupted lines in black, cyan and magenta, respectively. The bonds between water oxygen and the calcium ion are not shown.

energetical contribution of W848, L851 and L855 to HsCen2 binding. W848 is largely the most important residue followed by L851 and L855. Interestingly, the 5-mer XPC peptide (N847–L851) shows a reduced but significant affinity for HsCen2, with a K_a value of $2.5 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$. This suggests that the core of the centrin binding motif in XPC is constituted of the hydrophobic dyad W848/L851.

How does this observation compare with other centrin complexes studied so far? A solution structure of the C-terminal domain of *Chlamydomonas* centrin bound to Kar1 peptide has been reported.³⁹ The two centrin C-terminal domains superpose well (rmsd of 0.88 Å over 269 main-chain atoms). The overall position of the peptides is conserved and XPC residues W848 and L851 superpose well with equivalent position in Kar1 peptide W248 and L251. Interestingly, the position equivalent to L855 in XPC is the acid residue D255 in Kar1 and the two side-chains do not superpose. This is consistent with our

proposal on the key role played by the dyad W848/L851. The X-ray structure of *Saccharomyces cerevisiae* Cdc31 protein complexed with two or three repeats of Sfi1 protein was recently reported.⁴⁰ The relative position of the N and C-terminal domains in both proteins is different due to major conformational differences in the central helix. The C-terminal domain of HsCen2 superposes well with the homologous C-terminal domain of Cdc31 (rmsd of 0.57 Å over 248 main-chain atoms). Helical peptides Sfi1 and P17-XPC occupy similar positions relative to Cdc31 and HsCen2 binding pocket, respectively, though orientation of the two helices is reversed. Despite this major difference, the W848 side-chain in XPC peptide superposes well with an equivalent Trp position of Sfi1 (rmsd of 0.5 Å on atoms of the aromatic group). Similarly L851 side-chain from XPC superposes to the corresponding residue of Sfi1 (Phe or Leu). Divergences are more pronounced in the case of L855, which corresponds to residues of

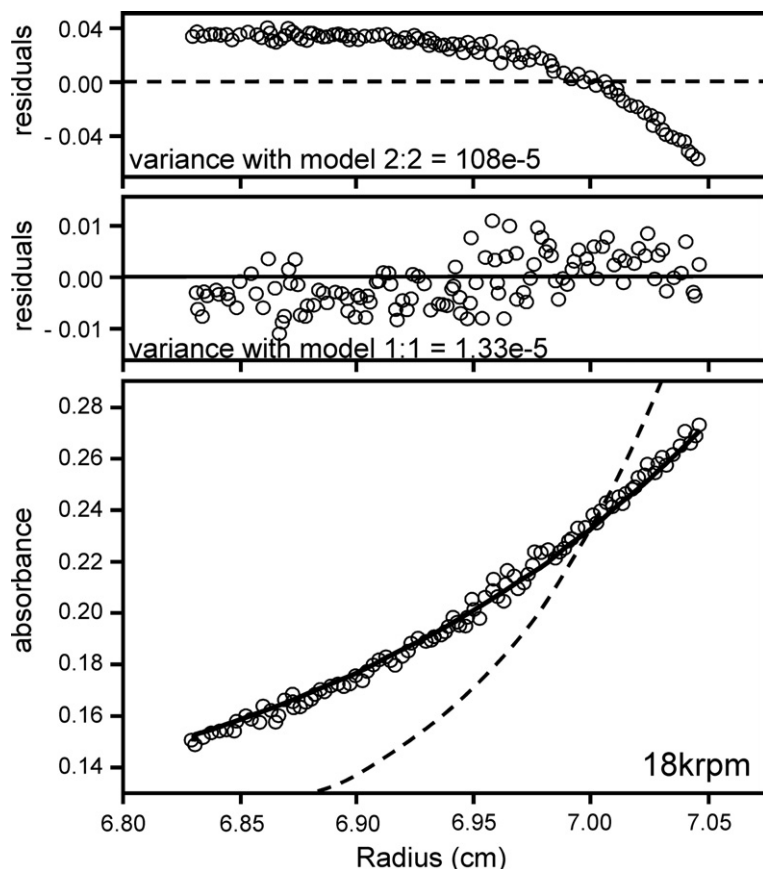


Figure 6. Analytical centrifugation analysis of the complex Δ N25-HsCen2/P17-XPC at ratio 1:1.2, at 2 mg/ml protein in 20 mM Tris-HCl (pH 6.7), 200 mM NaCl, 3 mM CaCl_2 . Data were collected on Beckman XLI ultracentrifuge at 20 °C with a four-cell rotor AN60-Ti. One scan acquired at 18,000 rpm, representative for the 12 scan set, is displayed in the bottom panel. The theoretical boundary of the 1:1 species is drawn as a thick line, while the boundary for 2:2 species is shown as a broken line. Corresponding residuals are plotted in the top panels.

Sfi1 repeats that are seldom hydrophobic. Consistent with this observation, the affinity of human Sfi1 repeats for HsCen2 were shown to be closer to those of the P10-XPC.⁴¹ The conserved hydrophobic dyad (W848/L851 in XPC) in the ligands of various homologous centrin (yeast, plants, human) clearly highlights a convergent interaction mode of centrin with their targets.

Cellular implications of HsCen2 interaction with the C-terminal region of XPC

As the cellular XPC content is significantly lower than the HsCen2 content,¹⁴ most of the centrin molecules are localized in the perinuclear and cytoplasmic space. This HsCen2 fraction is shifted towards the nucleus upon the transient increase of XPC concentration, as observed in the present imaging experiments. The substitution of the critical hydrophobic W848 in the XPC helical region N847–R863 cancels the interaction with HsCen2, and prevents the HsCen2 translocation. Substitution of the three XPC anchoring residues (W848, L851 and L855) also results in a significant reduction of the NER activity on UV-induced damages in XP4PASV cells.¹⁴ Therefore, the physical binding to XPC, the nuclear localization of HsCen2, and its contribution to the repair process are all mediated by the same molecular mechanism, with the structural and thermodynamic features characterized here.

The centrin binding site of XPC is located within the C-terminal segment (815–940) proposed to be

critical for the interaction with TFIIH.³⁴ Sequence analysis using disorder predictors,⁴² suggests that this segment is highly unstructured and flexible. Centrin binding may partially stabilize this region by burying the hydrophobic surface containing residues W848, L851 and L855. Consistently, a centrin-induced temperature resistance of the DNA binding activity of XPC was reported.⁷ The HsCen2/XPC complex formation could also control the DNA binding affinity/selectivity¹⁴ and the TFIIH recruitment.¹¹ More comprehensive studies on these NER aspects, in particular, of the protein dynamic complexes formed around XPC will shed more light on the precise role of centrin and other nuclear proteins that recognize and repair bulky DNA lesions. Due to the important role of centrin in centrosome duplication,³ the study of the HsCen2–XPC interaction opens also the possibility to assess the potential relationships between repair and cell division control.

Materials and Methods

Protein and peptide samples

The recombinant integral protein (HsCen2) was overexpressed in *Escherichia coli* strain (BL21(DE3)pLysS, Novagen) as described.^{23,27} The deletion construct Δ N25-HsCen2 cDNA, which lacks the first 25 residues, was sub-cloned into the expression vector pETBlue-1 (Novagen) and sequenced. The protein was overexpressed

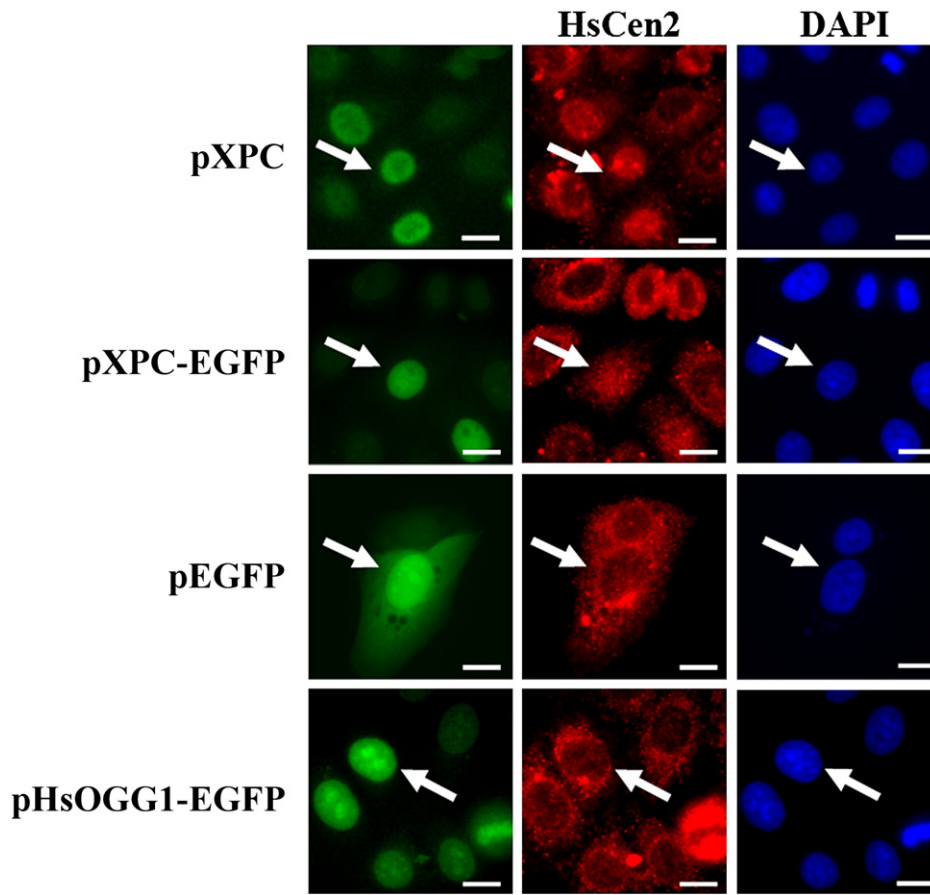


Figure 7. Detection of HsCen2 in HeLa cells after transient expression of XPC protein. HeLa cells (5×10^5) were transfected with the plasmid carrying XPC (top) or the plasmids carrying the indicated cDNA fused to EGFP ORF. DAPI was used to reveal DNA (right column, blue). XPC was detected by immunocytochemistry (top), while EGFP fusions were detected by direct observation (left column, green). HsCen2 was detected with rabbit anti-HsCen2 serum (middle column, red). DAPI was used to reveal DNA (right column, blue). Size bars represent 20 μm . White arrows point to the nucleus of typical transfected cells.

in *E. coli* Tuner (DE3)pLacI cells, grown at 37 °C. Purification of protein samples used three chromatographic steps including DEAE-TSK, phenyl-TSK, and G25 columns.¹⁹ The various synthetic peptides (Figure 1) at 95% purity were purchased from Biofidal (Vaulx-en-Verain, France) and from Hybio (Shenzhen, China). All the peptides are acetylated at the N-terminal end and amidated at the C-terminal end.

Plasmid pXPC-EGFP allowing expression in mammalian cells under the control of the human cytomegalovirus early promoter (BD Bioscience), and plasmid pXPC previously described³⁶ were generously provided by A. Pedrini. The site-directed mutagenesis of XPC or XPC-EGFP cDNA was performed using QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene). Five different clones for each mutation were isolated, DNA purified, tested for expression in mammalian cells, and sequenced. After transfection in HeLa cells, the protein production was monitored by immunocytochemistry and Western blot as described below.

Crystallographic study of the complex between $\Delta\text{N25-HsCen2}$ and P17-XPC

Crystals were obtained by vapor diffusion from a stock solution of the complex with 1 mM (16.9 mg ml^{-1}) $\Delta\text{N25-}$

HsCen2, 1.2 mM P17-XPC, 3 mM CaCl_2 , and 200 mM NaCl in 20 mM Tris buffer (pH 6.7). The complex (1.5 μl) was mixed with a reservoir solution (1.5 μl) with 30% mono-methyl polyethylene glycol (MPEG) 550, 100 mM NaCl and 100 mM, bicine (pH 9.0).²¹ The crystals were soaked in mother liquor with an additional 10% (v/v) ethylene glycol. A native data set was collected at the beam line ID29 of the European Synchrotron ESRF (Table 1). Space group of our crystals is the same as the one observed with full-length HsCen2 and unit cell dimensions are close.¹⁸

The structure was solved by molecular replacement²¹ before the publication of the structure by Thompson *et al.*¹⁸ was reported. The crystallographic structures of the N-terminal (amino acids 1–90) and C-terminal (amino acids 91 – 162) domains of troponin C were used separately as input models (PDB code 1TOP)⁴³ in the molecular replacement program PHASER⁴⁴ as implemented in the CCP4 package. We then performed multiple rounds of refinement and manual rebuilding using REFMAC⁴⁵ and TURBO⁴⁶ programs. TLS parameters were used to model anisotropic displacements using three regions: N-terminal region (Thr26 to Asn85), central helix (Phe86 to Phe113) and C-terminal region (Asp114 to Lys168). Two electron density peaks were observed in $F_o - F_c$ maps corresponding to calcium ions for each HsCen2 molecule. Calcium ions were first

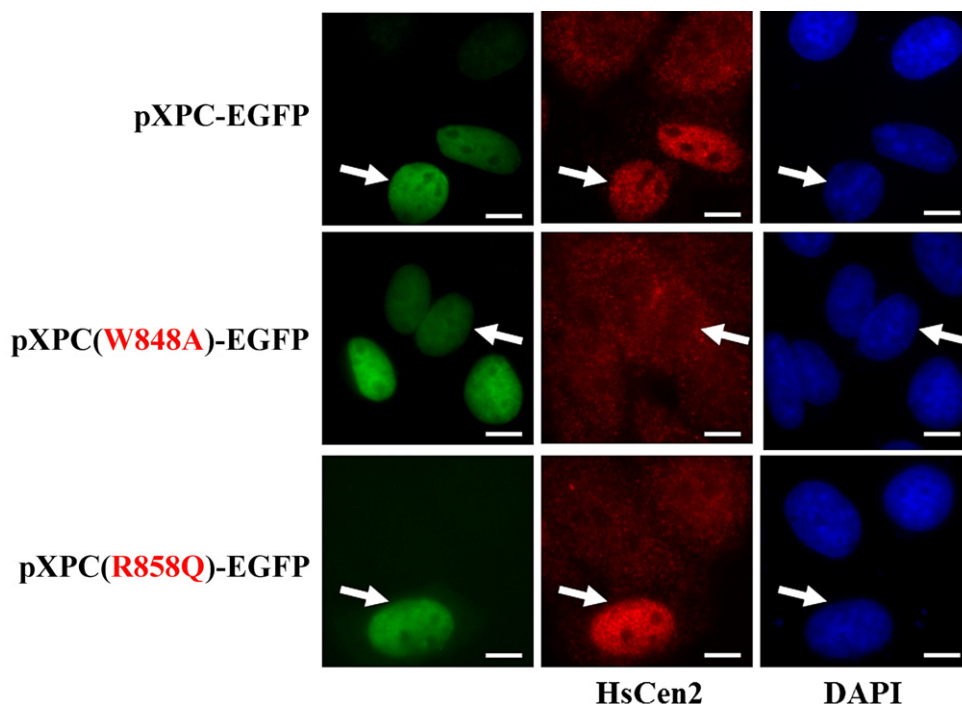


Figure 8. Expression of XPC-(W848A) in HeLa cells does not alter the localization of HsCen2. HeLa cells were transfected with XPC-EGFP, the mutated XPC-(W848A) or XPC-(R858Q) cDNAs as for Figure 7, and analyzed 48 h later (green, left column). HsCen2 was detected with mouse anti-HsCen2 serum (red, middle column). DAPI staining allows the visualization of the nuclear DNA (blue, right column). The white arrows indicate nuclei in XPC-transfected cells. Size bars represent 10 μ m.

refined with occupancy of 1.0. This occupancy was decreased by 0.1 step until the temperature factor of the calcium ions were comparable to those of their protein ligands.

Isothermal titration calorimetry

Thermodynamic parameters of molecular interactions between centrin and target peptides were investigated by ITC using a MicroCal MCS instrument (MicroCal Inc., Northampton, MA). The proteins and peptides were equilibrated in the same buffer containing 50 mM Mops (pH 7.4), 100 mM NaCl, 1 mM CaCl₂ or 2 mM EDTA. The centrin at 15–20 μ M in the calorimeter cell was titrated by the peptide (ten times more concentrated) by automatic injections of 8–10 μ l. The first injection of 2 μ l was ignored in the final data analysis. Integration of the peaks corresponding to each injection and correction for the baseline were done using Origin-based software provided by the manufacturer. The fit of the data to a single-site interaction model results in the stoichiometry (n), equilibrium binding constant (K_a) and enthalpy of complex formation (ΔH). All the experiments were repeated twice, and give similar results. Usually, control experiments, consisting in injecting peptide solutions into the buffer, were performed in order to evaluate the heat of dilution.

Analytical centrifugation

Sedimentation-diffusion equilibrium experiments were performed at 14,000, 16,000, 18,000 and 20,000 rpm (resolution 0.001 cm, integration over ten measurements). Three scans were acquired for each speed and absorbance

offsets were measured at 50,000 rpm. All scans were fitted together by minimization of the sum of the squared residuals, using the software Origin v6.0 (Microcal). The best fit corresponds to a mass of 19,020 Da for the monomeric 1:1 complex Δ N25-HsCen2/P17-XPC, with a variance of 1.33e-5.

Production of polyclonal anti-XPC antibodies

A fragment of the XPC ORF coding for the sequence 815–940 (named here XPC3) was sub-cloned into pETBlue-1 (Novagen), overexpressed in *E. coli* and purified. The lyophilized XPC3 polypeptide (700 μ g) was injected in three steps intradermally into three mice. Serum was collected before the first injection and ten days after each injection, and its specificity was determined by Western blot and immunocytochemistry as described.⁴⁷ The highest titers were obtained 20 days after the third injection and this fraction, named anti-XPC3, was further used in this work.

Cell culture and DNA transfection

AS1 (XPC fibroblasts transformed with SV40), XP44RO (cells derived from a testicular metastasis of an XP patient of group C), and XP44RO-complemented cells were described.⁴⁸ XP14BR⁴⁹ and XP14BR-complemented primary fibroblasts were obtained from A. Sarasin (Villejuif, France). Human cervical carcinoma HeLa cells were obtained from E. May (Villejuif, France). All cells were maintained at 37 °C in Dulbecco's modified Eagle's medium (GibcoBRL) supplemented with 10%(v/v) fetal calf serum, 100 units/ml of penicillin and 100 μ g/ml of streptomycin under 5% (v/v) CO₂. Transfection of HeLa

cells was performed using Lipofectamine, according to manufacturer's instructions (Invitrogen). Briefly, 3×10^5 cells were plated in 60 mm dishes, transfected 24 h later, further incubated for 48 h, harvested at the indicated times and analyzed.

Immunofluorescence staining and microscopy

Cells plated on glass coverslips in 60 mm dishes were treated as described.³⁵ Primary antibodies were revealed with Cy3™ or Cy2™ conjugated affinity purified goat anti-mouse or anti-rabbit IgG (Jackson Laboratories, Inc., USA; 2 µg/ml). Cells were counterstained with 4',6-diamino-2-phenylindole (DAPI; 4 µg/ml). XPC sera and HsCen2 antibody were diluted 1/100 and 1/1000, respectively. Immunofluorescence was detected using a Zeiss Axiophot 2 epifluorescence microscope coupled to a cooled Sensys 1400 camera from Photometrics monitored by the KS300 3.0 program. Representative fields for each cell line are presented.

Coordinates

The atomic coordinates and structure factors (code 2OBH) have been deposited in the Protein Data Bank, Research Collaboratory for Structural Bioinformatics, Rutgers University, New Brunswick, NJ‡.

Acknowledgements

This work was supported by the Centre National de la Recherche Scientifique, the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, the Institut Curie, The French/Bulgarian joint programme RILA (no. 09838PF) and Electricité de France (grand no. 8702). We thank M. Bornens and J. Azimzadeh for advise and anti-HsCen2 antibodies, A. Sarasin for several XP derived cell lines, W. Vermeulen and S. Bergink for providing the anti-XPC antibody, J. Salisbury for the 20H5 anti-centrin antibody, C. Creminon and M. Plaisance for obtaining mouse anti-XPC antibodies, A. Campalans for the HsOGG1-EGFP vector, and A. Pedrini for advise and providing us with mammalian expression vectors carrying XPC and XPC-EGFP. We thank the staff members of the ESRF in Grenoble on beam lines ID29 and FIP-BM30A for help in data collection. We also thank S. Zinn-Justin, B. Gilquin for helpful discussions and A. Le Maire for critical review of the manuscript.

Supplementary Data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.jmb.2007.08.046

References

- Schiebel, E. & Bornens, M. (1995). In search of a function for centrioles. *Trends Cell Biol.* **5**, 197–201.
- Salisbury, J. L. (1995). Centrin, centrosomes, and mitotic spindle poles. *Curr. Opin. Cell Biol.* **7**, 39–45.
- Salisbury, J. L., Suino, K. M., Busby, R. & Springett, M. (2002). Centrin-2 is required for centriole duplication in mammalian cells. *Curr. Biol.* **12**, 1287–1292.
- Paoletti, A., Bordes, N., Haddad, R., Schwartz, C. L., Chang, F. & Bornens, M. (2003). Fission yeast cdc31p is a component of the half-bridge and controls SPB duplication. *Mol. Biol. Cell*, **14**, 2793–2808.
- Sanders, M. A. & Salisbury, J. L. (1994). Centrin plays an essential role in microtubule severing during flagellar excision in *Chlamydomonas reinhardtii*. *J. Cell Biol.* **124**, 795–805.
- Paoletti, A., Moudjou, M., Paintrand, M., Salisbury, J. L. & Bornens, M. (1996). Most of centrin in animal cells is not centrosome-associated and centrosomal centrin is confined to the distal lumen of centrioles. *J. Cell Sci.* **109**, 3089–3102.
- Araki, M., Masutani, C., Takemura, M., Uchida, A., Sugawara, K., Kondoh, J. *et al.* (2001). Centrosome protein centrin 2/caltractin 1 is part of the xeroderma pigmentosum group C complex that initiates global genome nucleotide excision repair. *J. Biol. Chem.* **276**, 18665–18672.
- Molinier, J., Ramos, C., Fritsch, O. & Hohn, B. (2004). CENTRIN2 modulates homologous recombination and nucleotide excision repair in Arabidopsis. *Plant Cell*, **16**, 1633–1643.
- Daya-Grosjean, L. & Sarasin, A. (2005). The role of UV induced lesions in skin carcinogenesis: an overview of oncogene and tumor suppressor gene modifications in xeroderma pigmentosum skin tumors. *Mutat. Res.* **571**, 43–56.
- de Laat, W. L., Jaspers, N. G. J. & Hoeijmakers, J. H. J. (1999). Molecular mechanism of nucleotide excision repair. *Gen. Dev.* **13**, 768–785.
- Yokoi, M., Masutani, C., Maekawa, T., Sugawara, K., Ohkuma, Y. & Hanaoka, F. (2000). The xeroderma pigmentosum group C protein complex XPC-HR23B plays an important role in the recruitment of transcription factor IIIH to damaged DNA. *J. Biol. Chem.* **275**, 9870–9875.
- Volker, M., Monè, M. J., Karmakar, P., van Hoffen, A., Schul, W., Vermeulen, W. *et al.* (2001). Sequential assembly of the nucleotide excision repair factors in vivo. *Mol. Cell*, **8**, 213–224.
- Riedl, T., Hanaoka, F. & Egly, J.-M. (2003). The comings and goings of nucleotide excision repair factors on damaged DNA. *EMBO J.* **22**, 5293–5303.
- Nishi, R., Okuda, Y., Watanabe, E., Mori, T., Iwai, S., Masutani, C. *et al.* (2005). Centrin 2 stimulates nucleotide excision repair by interacting with xeroderma pigmentosum group C protein. *Mol. Cell Biol.* **25**, 5664–5674.
- Liang, L., Flury, S., Kalck, V., Hohn, B. & Molinier, J. (2006). CENTRIN2 interacts with Arabidopsis homolog of the human XPC protein (AtRAD4) and contributes to efficient synthesis-dependent repair of bulky DNA lesions. *Plant Mol. Biol.* **61**, 345–356.
- Popescu, A., Miron, S., Blouquit, Y., Duchambon, P. & Craescu, C. T. (2003). Xeroderma pigmentosum group C protein possesses a high affinity binding site for human centrin 2 and calmodulin. *J. Biol. Chem.* **278**, 40252–40261.

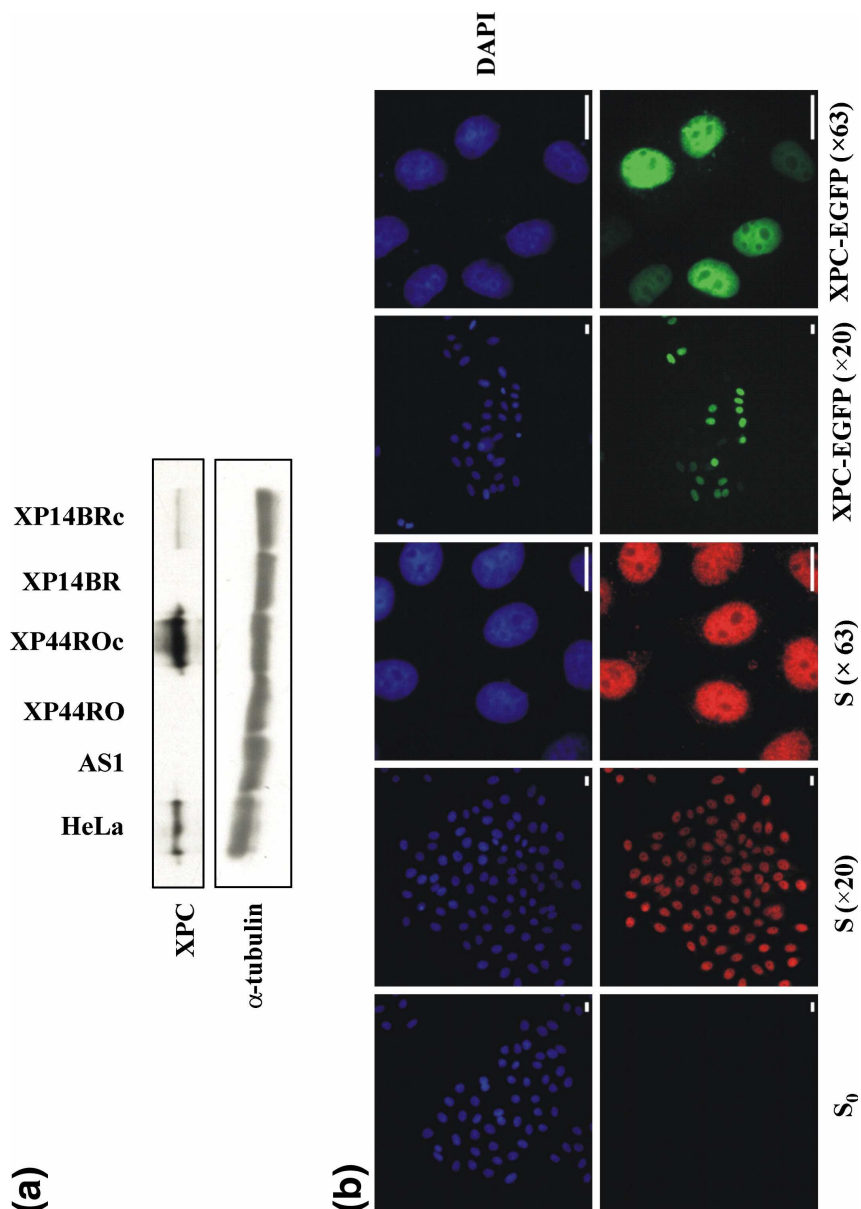
‡ <http://www.rcsb.org>

17. Yang, A., Miron, S., Mouawad, L., Duchambon, P., Blouquit, Y. & Craescu, C. T. (2006). Flexibility and plasticity of human centrin 2 binding to the protein XPC from nuclear excision repair. *Biochemistry*, **45**, 3653–3663.
18. Thompson, J. R., Ryan, Z. C., Salisbury, J. L. & Kumar, R. (2006). The structure of the human centrin 2-xeroderma pigmentosum group C protein complex. *J. Biol. Chem.* **281**, 18746–18752.
19. Yang, A., Miron, S., Duchambon, P., Assairi, L., Blouquit, Y. & Craescu, C. T. (2006). The N-terminal domain of human centrin 2 has a closed structure, binds calcium with a very low affinity, and plays a role in the protein self-assembly. *Biochemistry*, **45**, 880–889.
20. Tourbez, M., Firanescu, C., Yang, A., Unipan, L., Duchambon, P., Blouquit, Y. & Craescu, C. T. (2004). Calcium-dependent self-assembly of human centrin 2. *J. Biol. Chem.* **279**, 47672–47680.
21. Charbonnier, J. B., Christova, P., Shosheva, A., Stura, E., Le Du, M. H., Blouquit, Y. *et al.* (2006). Crystallization and preliminary X-ray diffraction data of the complex between human centrin 2 and a peptide from the protein XPC. *Acta Crystallog. sect. F*, **62**, 649–651.
22. Lutz, W. H., Lingle, W. L., McCormick, D., Greenwood, T. M. & Salisbury, J. L. (2001). Phosphorylation of centrin during the cell cycle and its role in centriole separation preceding centrosome duplication. *J. Biol. Chem.* **276**, 20774–20780.
23. Matei, E., Miron, S., Blouquit, Y., Duchambon, P., Durussel, I., Cox, J. A. & Craescu, C. T. (2003). The C-terminal half of human centrin 2 behaves like a regulatory EF-hand domain. *Biochemistry*, **42**, 1439–1450.
24. Crivici, A. & Ikura, M. (1995). Molecular and structural basis of target recognition by calmodulin. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **24**, 85–116.
25. Taillon, B. E., Adler, S. A., Suhan, J. P. & Jarvik, J. W. (1992). Mutational analysis of centrin: an EF-hand protein associated with three distinct contractile fibers in the basal body apparatus of *Chlamydomonas*. *J. Cell Biol.* **119**, 1616–1624.
26. Ivanovska, I. & Rose, M. D. (2001). Fine structure analysis of the yeast centrin, Cdc31p, identifies residues specific for cell morphology and spindle pole body duplication. *Genetics*, **157**, 503–518.
27. Durussel, I., Blouquit, Y., Middendorp, S., Craescu, C. T. & Cox, J. A. (2000). Cation- and peptide-binding properties of human centrin 2. *FEBS Letters*, **472**, 208–212.
28. Falke, J. J., Drake, S. K., Hazard, A. L. & Peersen, O. B. (1994). Molecular tuning of ion binding to calcium signaling proteins. *Quart. Rev. Biophys.* **27**, 219–290.
29. Kateb, F., Abergel, D., Blouquit, Y., Duchambon, P., Craescu, C. T. & Bodenhausen, G. (2006). Slow backbone dynamics of the C-terminal fragment of human centrin 2 in complex with a target peptide probed by cross-correlated relaxation in multiple-quantum NMR spectroscopy. *Biochemistry*, **45**, 15011–15019.
30. Hoeflich, K. P. & Ikura, M. (2002). Calmodulin in action: diversity in target recognition and activation mechanisms. *Cell*, **108**, 739–742.
31. Lupas, A., Van Dyke, M. & Stock, J. (1991). Predicting coiled coils from protein sequences. *Science*, **252**, 1162–1164.
32. Janin, J. (1997). Specific versus non-specific contacts in protein crystals. *Nature Struct. Biol.* **4**, 973–974.
33. Masutani, C., Araki, M., Sugasawa, K., van der Spek, P. J., Yamada, A., Uchida, A. *et al.* (1997). Identification and characterization of XPC-binding domain of hHR23B. *Mol. Cell. Biol.* **17**, 6915–6923.
34. Uchida, A., Sugasawa, K., Masutani, C., Dohmae, N., Araki, M., Yokoi, M. *et al.* (2002). The carboxy-terminal domain of XPC protein plays a crucial role in nucleotide excision repair through interactions with transcription factor IIIH. *DNA Rep.* **1**, 449–461.
35. Biard, D. S. F., Emmanuelle, D., Alain, S. & 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.
36. Santagati, F., Botta, E., Stefanini, M. & Pedrini, A. M. (2001). Different dynamics in nuclear entry of subunits of the repair/transcription factor TFIIH. *Nucl. Acids Res.* **29**, 1574–1581.
37. Errabolu, R., Sanders, M. A. & Salisbury, J. L. (1994). Cloning of a cDNA encoding human centrin, an EF-hand protein of centrosomes and mitotic spindle poles. *J. Cell Sci.* **107**, 9–16.
38. Sugasawa, K., Masutani, C., Uchida, A., Maekawa, T., van der Spek, P. J., Bootsma, D. *et al.* (1996). HHR23B, a human Rad23 homolog, stimulates XPC protein in nucleotide excision repair in vitro. *Mol. Cell. Biol.* **16**, 4852–4861.
39. Hu, H. & Chazin, W. J. (2003). Unique features in the C-terminal domain provide caltractin with target specificity. *J. Mol. Biol.* **330**, 473–484.
40. Li, S., Sandercock, A. M., Conduit, P., Robinson, C. V., Williams, R. L. & Kilmartin, J. V. (2006). Structural role of Sfi1p-centrin filaments in budding yeast spindle pole duplication. *J. Cell Biol.* **173**, 867–877.
41. Martinez-Sanz, J., Yang, A., Blouquit, Y., Duchambon, P., Assairi, L. & Craescu, C. T. (2006). Binding of human centrin 2 to the centrosomal protein hSfi1. *FEBS J.* **273**, 4504–4515.
42. Dunker, A. K., Lawson, J. D., Brown, C. J., Williams, R. M., Romero, P., Oh, J. S. *et al.* (2001). Intrinsically disordered protein. *J. Mol. Graph. Model.* **19**, 26–59.
43. Satyshur, K., Pyzalska, D., Greaser, M., Rao, S. & Sundaralingam, M. (1994). Structure of chicken skeletal muscle troponin C at 1.78 Å resolution. *Acta Crystallog. sect. D*, **50**, 40–49.
44. McCoy, A. J., Grosse-Kunstleve, R. W., Storoni, L. C. & Read, R. J. (2005). Likelihood-enhanced fast translation functions. *Acta Crystallog. sect. D*, **61**, 458–464.
45. Murshudov, G., Vagin, A., Lebedev, A., Wilson, K. & Dodson, E. (1999). Efficient anisotropic refinement of macromolecular structures using FFT. *Acta Crystallog. sect. D*, **55**, 247–255.
46. Roussel, A. & Cambillau, C. (1991). *TURBO-FRODO. Silicon Graphics Geometry Partners Directory*. Silicon Graphics, Mountain View, California, USA.
47. Miccoli, L., Biard, D. S., Creminon, C. & Angulo, J. F. (2002). Human kin17 protein directly interacts with the simian virus 40 large T antigen and inhibits DNA replication. *Cancer Res.* **62**, 5425–5435.
48. Masson, C., Menaa, F., Pinon-Lataillade, G., Frobert, Y., Chevillard, S., Radicella, J. P. *et al.* (2003). Global genome repair is required to activate KIN17, a UVC-responsive gene involved in DNA replication. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **100**, 616–621.
49. Arlett, C. F., Plowman, P. N., Rogers, P. B., Parris, C. N., Abbaszadeh, F., Green, M. H. *et al.* (2006). Clinical and cellular ionizing radiation sensitivity in a patient with xeroderma pigmentosum. *Br. J. Radiol.* **79**, 510–517.

Figure S1: Alignment of XPC sequences.

gi 1722884 Homo sapiens	FD-----FH	GGYSHPVTDG	YIVCEBFKDV	ILTAWENEQA	VIEREKEKEK	EKRALGNWKL	LAKGLLIRER	LKRRYGPKSE
gi 109097997 Macaca mulatta	FD-----FH	GGYSHPVTDG	YIVCEBFKDV	ILTAWENEQA	IIEKKEKEKR	EKRALGNWKL	LAKGLLIRER	LKRRYGPKSE
gi 55728428 Pongo pygmaeus	FD-----FH	GGYSHPVTDG	YIVCEBFKDV	ILTAWENEQA	IIEKKEKEKR	EKRALGNWKL	LAKGLLIRER	LKRRYGPKSE
gi 62647838 Rattus norvegicus	FD-----FH	GGYCHPVTDG	YVVCBFRDVF	LLAAWENEQA	LIEKKEKEKK	EKRALGNWKL	LVRGLLIRER	LKLRYGAKSE
gi 51338725 Mus musculus	FD-----FH	GGYCHPVTDG	YVVCBFRDVF	LLAAWENEQA	LIEKKEKEKK	EKRALGNWKL	LVRGLLIRER	LKLRYGAKSE
gi 73984961 Canis familiaris	FD-----FH	GGYSHPIVDG	YIVCEBFKDV	LLAAWENEQA	LIEKKEKEKR	EKRALGNWKL	LARGLLIRER	LKLRYGDESG
gi 50754427 Gallus gallus	FD-----FH	GGYSHAVTDG	YVVCBFFKEV	LLAAWENEQA	ETEKKEKEKR	EKRALGNWKL	LTKGLLIRER	LKQRYSIKVE
gi 47220487 Tetraodon nigrovir	FD-----FH	GGYSHAVTDG	YVVCBFFKEI	LLAAWLEEQE	LLKQKEKEKR	EKRVTSNWAL	LTKGLLIREK	LKKRYSTKNQ
gi 113680968 Danio rerio	FD-----YH	CGFAHAVNDG	YIVCEBHEEI	LKAAWENEQE	IQQKKEQEKR	EKRAVTNWTL	LTKGLLIRER	LKRRYGGQGL
gi 108880562 Aedes aegypti	FD-----FH	GGSSHPVYDG	FVVCBFFKDI	VVDAWYQEQE	QEEKREKEY	EKRVTGNWKK	LTKGLLIRRR	LQNKYFNQDL
gi 58385839 Anopheles gambiae	FD-----FH	GGSSHPVYDG	FVVCBFFKDV	VVDAWHEEQE	AEEQAREKY	EKRVTGNWKK	LTKGLLIRRR	LQNKYFNQDL
gi 115476494 Oryza sativa	FDYR-----	NTRGLPVDG	YVVCBFFKNT	LLAAYAEQEE	RRQAEERKQE	EAQALIRWYQ	LLCSVVTQR	LKDSYKAPSS
gi 17136712 Drosophila melanog	FD-----FH	QGACHPMYDG	FVVCBFFREV	VTAWEEDQQ	VQVLKQEKY	ETRVYGNWKK	LTKGLLIRER	LKKKYNF---
gi 54635281 Drosophila pseudoo	FD-----FH	QGACHPMLDG	FVVCBFFREV	VCAWEEDQQ	EQARKEQEKY	ETRVYGNWKK	LTKGLLIRER	LKKKYNF---
gi 58265896 Cryptococcus neofo	FEFK-----	KQRAVPIIKG	IIVVAEKKQE	VLDAYEESTI	AAEEERMKR	EDRALKRWK	LVRGLLIRER	LQOYEGSKDK
gi 91087279 Tribolium castaneu	FD-----FH	GGWNPVTDG	YVVCBFFADV	LLAAYAEQEE	LLERKEQEKI	DKRVYGNWKR	LTKGLLIRER	LKVYEFGES
gi 22326854 Arabidopsis thalia	FEYR-----	SGGATPIFEG	IIVVCTEFKDT	LLAAYAEQEE	KKEEBERRR	EAQAASRYQ	LLSSILTRER	LKNRYANNSN
gi 110759067 Apis mellifera	FN-----FG	SMGATPAMEG	YVVCIEVEDI	PREAWVEQA	EAVKRTKEKK	DKRVYGNWKR	LTKGLLIRER	LAAKYEFSE-
gi 83767353 Aspergillus oryzae	FDFK-----	GRHGTAIVQG	VVVAEKVEEA	EKEVLGLED	QKLQAELEQK	SAESLRLWKH	FLKGLRIAER	VQSYAVEGEE
gi 70989535 Aspergillus fumiga	FDFK-----	NRHGLPVDG	IIVVASEFQEA	VEEVLKALEE	ERRQTESQEK	SRETLRLWKH	FLKGLRIAER	VKSYTIEGEE
gi 67526865 Aspergillus nidula	FSFK-----	GRHGTAIIKG	VVVAASEYKEA	VEEVLKALEE	EKLQNEQEE	AVEVLRAWKN	LLMKLRIAER	VKGYVIEG-E
gi 90306385 Coccidioides immit	FQFR-----	ARHGTAIVTG	IIVVASEHREA	LLAVISGLEE	ERGQAEQDRR	TMAALSMWRQ	LLIKLRIAER	VQGYTFEGEE
gi 115399208 Aspergillus terre	FEFK-----	GRHGTAIVQG	IIVVASEYCEA	VEEVLKALEE	QRLQSEQDER	SAQVLRWRH	FLKGLRIAER	VKGYAAEGEE
gi 111064898 Phaeosphaeria nod	FSFK-----	GRGTAIVQG	VVVAASEYAEA	VQEEVDGMIY	QEEEAANAAR	SRESLRLWR	FELGLRIAER	VNAMEIDGK
gi 85105352 Neurospora crassa	FEFG-----	NRMAMPVQVQ	VVVAEBHHDQ	VMEEVAKDEA	EKKRKEDEKR	RKAALGMWRK	LLMGMRIVER	IKQDYGHVGD
gi 39944606 Magnaporthe grisea	FEFK-----	GRGTAIVLKG	AVVPIESEEA	IMAVINGIQE	MEADAEER	QRLLRMWVK	FLKGLRIAER	VYA-----
gi 39594180 Caenorhabditis bri	WA-----FD	GGTTHPVTDG	AVVLEKDAAL	FRREWEKLEE	GKAERENAR	VERIHENWKK	LTKGLLIRER	VRKQFGHNHP
gi 19115556 Schizosaccharomyce	FDFO-----	RKYSKPKLEG	VVVAEKVEEA	EDLIAEEDID	BEKEAEARNV	RKTCLLWKR	LTKGLLIRER	VFEYEG----
gi 46127989 Gibberella zeae	FSFK-----	GRGTAIVLKG	VVVAEKVEEA	VRTIIESLGD	LEQVEEDERR	RHRALKAWRK	FMMALRIAER	IWS-----
gi 25148477 Caenorhabditis ele	WA-----FD	GGTTHPVTDG	AVVLEKDAID	FINAWEKLES	GRAEKBEKQR	VEKIHENWKK	LTKGLLIRER	VRKQFGHPAA
gi 19075328 Schizosaccharomyce	FEFR-----	KHRAIPVTTG	IIVVPEESAQM	VVEEFLCEK	IRIEKQOMKE	RKIYIYQWKH	LLNALIRER	IEEQYA----
gi 50550231 Yarrowia lipolytic	FDFTK-----	GRQIKPRIDG	VVVAEKYAKD	VADVSDMQE	QTLAKERNR	EVALLRWRR	YLTALKIRHR	LDAEHGEVEL
gi 76649525 Bos taurus	FD-----FH	KGYCHPVTDG	YVVCBFFKDV	ILTAWENEQA	LIEKKEKEKR	EKRALGNWKL	LAKGLLIRER	LKLRYGAQSE
gi 50311411 Kluyveromyces lact	FKFES-----	GRRVKPKVTG	VVVENEVYDA	LVAVIENIEE	CNDDAARHEL	ELEALNGWKL	LLTKLIRKSR	LVEEHGAVAD
gi 50293731 Candida glabrata	FKFEK-----	GRSVKPSITG	VVVALWFRDA	LVAAIDGITQ	ANAEBKHIEH	ELEALSWMN	LLTKLIRKSR	LNSEYQKVN
gi 116054955 Ostreococcus taur	FEYK-----A	GGKTLPLFNG	IIVVCEBFKDE	LLKRHEDAEE	ARRITLAKA	YKEACAHWRL	LLGAIWTRAR	LKDEFQDQVT
gi 68472051 Candida albicans	FSFKG--KFK	KHNITAREGG	IIVVAKVEEA	MOLTIDNIEE	QEEEDORALS	EANALRNWYK	FLKGLLIRER	LKNSHGAILD
gi 131813 Saccharomyces cerevi	FKFER-----	GSTVKPVLSE	IIVVAKWLR	ETAIDGIEF	IQEDDNRKEH	LLGALESWNT	LLKGLLIRER	LNSTYKIAE
gi 71408900 Trypanosoma cruzi	FQRRRLDERR	FSHWBAVLDG	IIVVREADAAN	LLHAYDEWRQ	LTEEQEATKR	RQRANRWLH	LVRQMLAMQR	VRQQYLDGAS
gi 111226219 Dictyostelium dis	WENG-----	PKSSYPIIDG	VVVAKKFSSK	LLDTWLSSESS	SRAEAEQKK	NDEIKARWKR	FMKLLIKNY	IEKTYK----
gi 72548891 Leishmania major s	FERRRIDEHR	RGWETVING	IIVVLEKTSVA	LLHAYEAWWQ	LVQEQEATKR	RQRAFHWLH	LAQRLLALKR	LQDQYAKGLG
gi 50427359 Debaryomyces hanse	FNFAS---K	IGQAIPVKQK	VVVAELQAVL	AKKIWLGYKI	KRYETKYREN	KLRLSNWKE	VTKRLIRKSR	VEETYGDME-
gi 89285742 Tetrahymena thermo	FEEST-----A	SGRSHVVKNG	ILAHKKDEER	LRQIYQDNYE	IMKAQCAENL	KKELMGFRK	IFKGLLIRER	LSDRQNKISM
gi 32398738 Cryptosporidium pa	HD-----FK	NG-SKPNYDG	VVVAKKKQVTL	ILQSLKRRFEL	MNINKMANFI	WNDVLQSAKD	FLNSLSRNNL	SKNTLNKDYD
gi 71237471 Cryptosporidium ho	YD-----FK	NG-SKPKYDG	VVVAKKKQVTL	FQSLKRRFEL	MNINKMANFI	WNDVLQSAKD	FLNSLSRNNL	SKNTLNKDYD
gi 85000997 Theileria annulata	LR-----YE	GGTLKPKIDG	VVVAELQAVL	FLKLYNEYVE	L-----	-----ISKNE	LFEDLEIAKF	WKTVFKRLLN
gi 71032503 Theileria parva	FH-----YE	DGSVKAKING	VVVAELQAVL	FLKLYNEYVE	L-----	-----I	LFEDLEIAKF	HRIDFRE---
gi 115640613 Strongylocentrotu	WD-----FH	SGYIHPVMDG	FVVCBFFHVDV	VVAWEEDKA	EHEKKEKEKR	EARAMNHWKL	FLKGLLIRER	LKHRYGENNP
gi 42552662 Gibberella zeae	FEFG-----	HRMAMPVQVQ	VVVAEBNHDM	VVVELEKDEA	BRARBEDEKR	RKKALAQWR	FLMGMRIAER	IRQYEGEITD
gi 70831614 Trypanosoma brucei	YRRRLNEAR	SSAYEVIQD	IIVVKEITNGS	VVVAEWEWKQ	LTEEQEAAKR	KQRAYRWMMH	FVQHRLAYLR	IRQQYLEGAT
gi 19068446 Encephalitozoon cu	FS-----	--RGVPPVNRG	IIVVLEKQVTL	FSNFLAQYCR	YLEMKERSEC	RSMGLKRRRI	LIRNASRYLR	IRKSLGLK-

Figure S2: Characterization of anti-XPC antibody. Mouse anti-XPC serum was tested by Western blot and immunolabelling. (a) Six total protein extracts were separated onto an 8% polyacrylamide gel and transferred onto a nitrocellulose membrane. Anti-XPC serum and anti- α -tubulin antibody were diluted 1/1000 and 1/2000, respectively. Primary (XP41BR) and transformed (AS1 and XP44RO) XP-C patients fibroblasts; two cell lines complemented with XPC's cDNA (XP44ROc and XP14BRc); and HeLa cells were analyzed. (b) HeLa cells were fixed in formaldehyde and labelled with mouse serum before (S_0) and after injection of the peptide (S). Nuclear localization of XPC is compared between immunolabelling with anti-XPC mouse serum and transfection of the cells with pXPC-EGFP. DNA is revealed by DAPI. Magnification: X20 or X63.



Résultats additionnels de l'article 1

XPC interagit directement avec la centrine 2, mais pas avec la centrine 3

Chez l'homme, il existe plusieurs isoformes de centrines dont deux ont une expression ubiquitaire, les centrines 2 et 3. Ces deux centrines présentent 54% d'homologie et n'ont pas les mêmes fonctions dans la cellule (Salisbury et al, 2002 ; Middendorp et al, 2000). Nous avons voulu vérifier, d'une part que la centrine 2 interagissait bien avec XPC dans les cellules humaines, et d'autre part si XPC pouvait lier la centrine 3. Nous avons donc immunoprécipité des extraits nucléaires de cellules HeLa avec des anticorps anti-centrine 2 ou 3 (Figure 1.1). Cette expérience a été réalisée en collaboration avec Juliette Azimzadeh de l'équipe de M. Bornens (Institut Curie, Paris). Après immunoprécipitation (IP) des extraits, nous avons analysé les surnageants et les extraits d'IP par Western blot. Après avoir validé nos conditions d'IP (Figure.20-A), nous avons testé la présence de XPC (Figure 20-B). Nous observons ainsi une bande correspondant à la taille de XPC (125 kDa) après l'IP avec l'anti-centrine 2. L'IP avec la centrine 3 n'a pas permis d'immunoprécipiter XPC. XPC interagit donc directement avec la centrine 2 mais pas avec la centrine 3 ou avec de très faibles quantités indétectables dans nos conditions de Western blot.

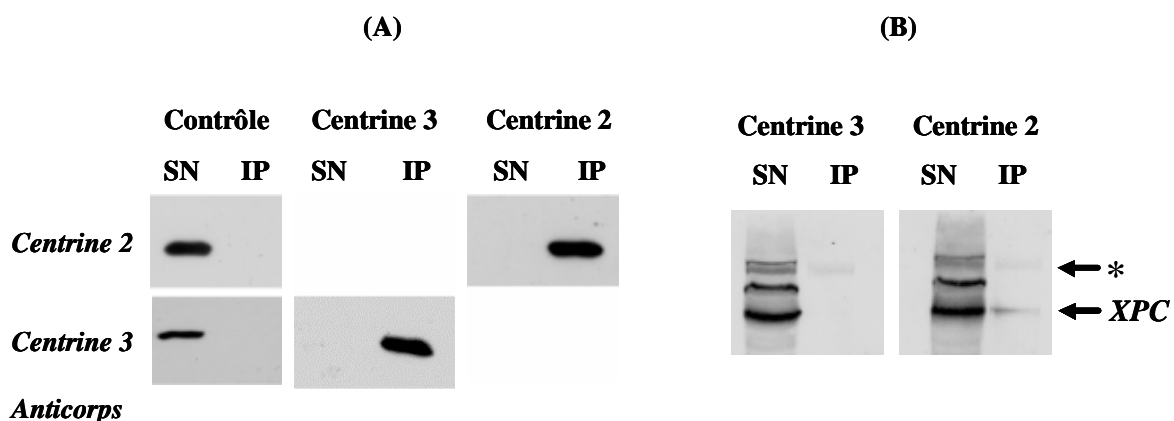


Figure 20. La centrine 2 peut immunoprécipiter XPC dans des extraits nucléaires de cellules humaines. (A) Marquages contrôles de l'IP. Les deux IP ont permis d'immunoprécipiter quantitativement les centrines 2 et 3 ; aucune de ces deux protéines n'a été détectée dans les surnageants d'IP (SN). (B) Marquage des extraits avec un anticorps anti-XPC (souris : 1/1000). Une bande aspécifique (*) de haut poids moléculaire (150 kDa) très fine a été détectée dans les deux IP alors que la bande spécifique correspondant à XPC n'est présente que lors de l'IP avec la centrine 2.

La surexpression de XPC entraîne un transfert de la centrine 2 cytoplasmique dans le noyau

Nous avons observé par imagerie que l'augmentation de XPC entraînait une augmentation de la centrine 2 dans le noyau en fonction de l'intégrité du résidu W848. Nous avons confirmé ces résultats par un fractionnement biochimique de cellules HeLa. Ce fractionnement nous a également permis d'analyser plus précisément la localisation subcellulaire de la centrine 2 (Figure 21). Cette technique fait intervenir une série de centrifugations où le culot cellulaire est resuspendu dans différents tampons qui permettent d'isoler dans les surnageants : les protéines cytoplasmiques (fractions S2 et STM), les protéines nucléaires solubles (fractions TW et LS), et les protéines ancrées à la chromatine et libérées par 3 concentrations croissantes de sels (fractions 0,3 ; 0,5 et 2, correspondant à 0,3 ; 0,5 et 2 M NaCl, respectivement). Les extraits des différentes fractions et un extrait total (WCE) sont ensuite analysés par Western blot.

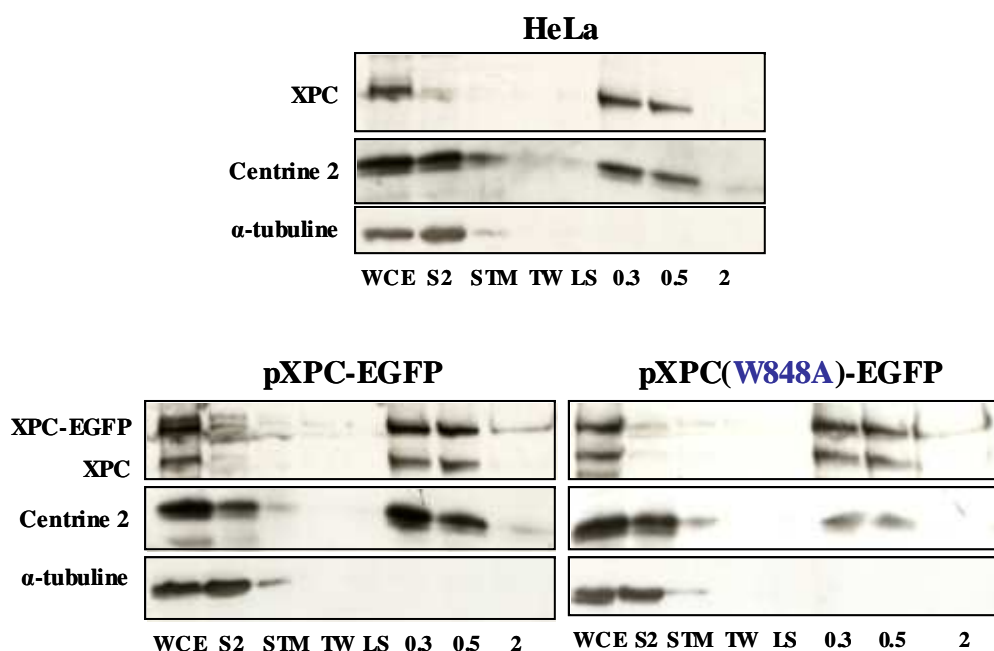


Figure 21. L'augmentation de la quantité de la centrine 2 nucléaire dépend du résidu W848 de XPC. Après fractionnement, les différents extraits protéiques ont été analysés par Western blot. Pour chaque extrait sont représentés l'extrait total (WCE), les extraits cytoplasmiques (S2 et STM), les extraits nucléaires solubles (TW et LS) et les fractions protéiques obtenues en présence de différentes quantités de sels (0,3 ; 0,5 et 2). Les membranes ont été marquées avec un anticorps anti-XPC (souris : 1/1000), anti-centrine 2 (lapin : 1/2000) ou anti- α -tubuline (souris : 1/2000).

Après fractionnement des cellules HeLa, la protéine XPC est détectée dans les fractions 0,3 et 0,5, confirmant que la majorité de XPC est nucléaire et attachée à la chromatine (Wang et al, 2004b). Comme nous l'avons observé par immunofluorescence, la centrine 2 est répartie de façon plus homogène dans la cellule : on la retrouve ainsi dans les fractions cytoplasmiques (majoritairement S2) et dans les fractions nucléaires similaires à XPC. La centrine 2 ne peut pas lier l'ADN (Nishi et al, 2005). La centrine 2 nucléaire serait donc complexée à XPC.

La transfection transitoire des cellules avec le plasmide codant pour la protéine de fusion XPC-EGFP permet de la différencier de la protéine endogène par Western blot car l'EGFP a un poids moléculaire de 27 kDa. Le fractionnement montre que la protéine étiquetée est localisée dans les mêmes fractions que la protéine endogène. La quantité totale de centrine 2 augmente après expression du plasmide, ainsi que dans les fractions 0,3 et 0,5. Par contre les fractions cytoplasmiques S2 et STM présentent une quantité légèrement réduite. La surexpression de XPC a donc induit une augmentation globale et nucléaire de la quantité de centrine 2, et une légère diminution des fractions cytoplasmiques. Il est donc vraisemblable que la centrine 2 a été « transférée » du cytoplasme vers le noyau à cause de l'augmentation de la concentration nucléaire de XPC. L'utilisation du logiciel Psort II Prediction (<http://psort.ims.u-tokyo.ac.jp/form2.html>) nous a indiqué que la séquence protéique de la centrine 2 ne comportait pas de signal de localisation nucléaire (NLS, « Nuclear Localisation Signal »). L'importation de la centrine 2 dans le noyau dépendrait donc de la présence de XPC.

L'expression du variant XPC(W848A)-EGFP ne permet pas d'augmenter la quantité de centrine 2 nucléaire. Ceci confirme que le résidu W848 est critique pour l'interaction entre XPC et la centrine 2 dans les cellules et pour la localisation nucléaire de la centrine 2. De plus, la majorité de la centrine 2 nucléaire étant liée à XPC, ce complexe existerait ancré à la chromatine en conditions basales.

Le complexe XPC/centrine 2 est localisé aux sites des dommages induits par les UVC

La protéine XPC se concentre très rapidement sur les sites des lésions induits par les UV, permettant ainsi à la machinerie moléculaire du NER de se mettre en place. Nous avons

souhaité savoir si la centrine 2 pouvait se localiser sur les dommages de l'ADN, seule ou complexée à XPC.

Nous avons utilisé une technique d'irradiation aux UVC localisée : un filtre en polycarbonate contenant des pores de 5 μm est déposé sur les cellules avant l'irradiation. Les UVC sont alors focalisés, ce qui permet d'observer l'accumulation de certaines protéines dans des zones discrètes du noyau. Nous avons transfecté des cellules de patients XP-C (AS1) avec différentes constructions de XPC-EGFP afin qu'aucune protéine endogène fonctionnelle ne se substitue à la protéine de fusion. Nous avons tout d'abord vérifié que l'expression de XPC dans ces cellules induisait bien les mêmes effets que dans les cellules HeLa, c'est-à-dire une augmentation de la centrine 2 nucléaire (non présenté).

La protéine de fusion XPC-EGFP et le variant XPC(R858Q)-EGFP se localisent aux dommages induits par les UVC, visualisés grâce à un marquage des cellules avec un anticorps dirigé contre des lésions spécifiques des UV, les CPD (Figure 22-A). Nous avons observé que le variant XPC(W848A)-EGFP qui n'interagit pas avec la centrine pouvait s'accumuler rapidement (10 minutes) sur les sites des lésions CPD. L'accumulation de XPC dans les zones nucléaires endommagées est donc indépendante de l'interaction avec la centrine 2.

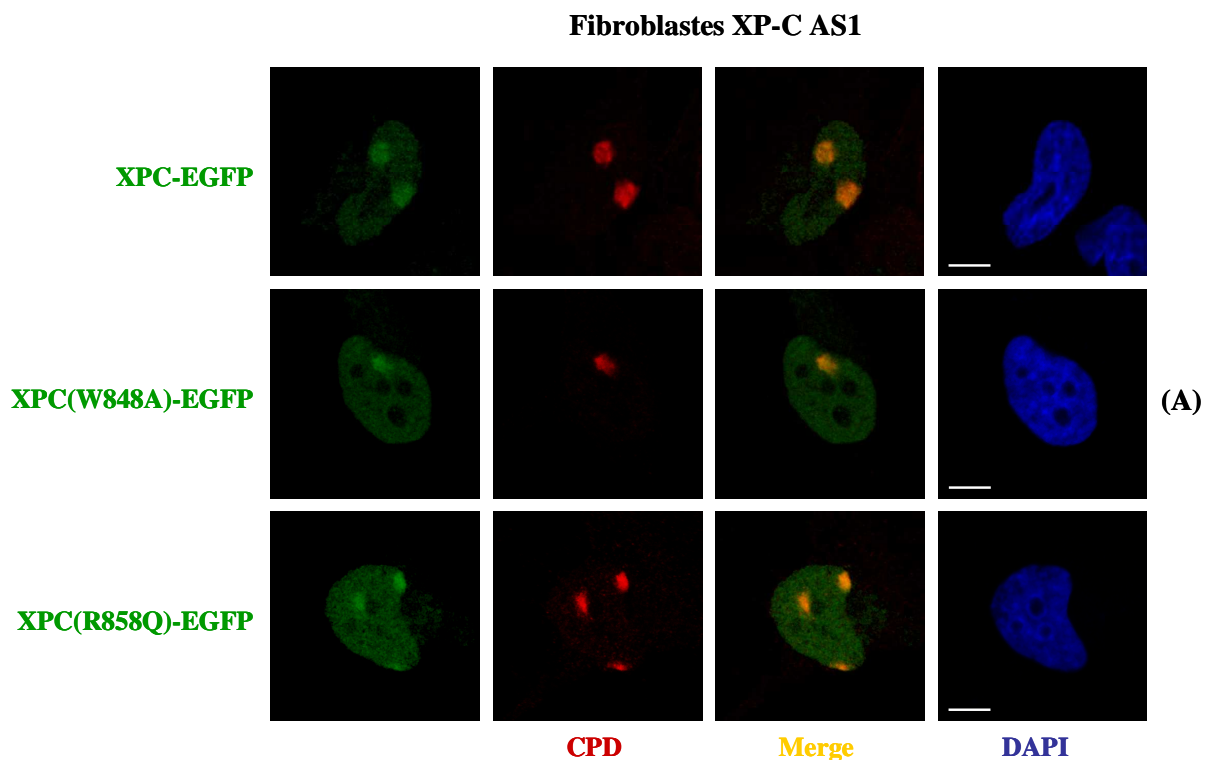


Figure 22 (continue page 97)

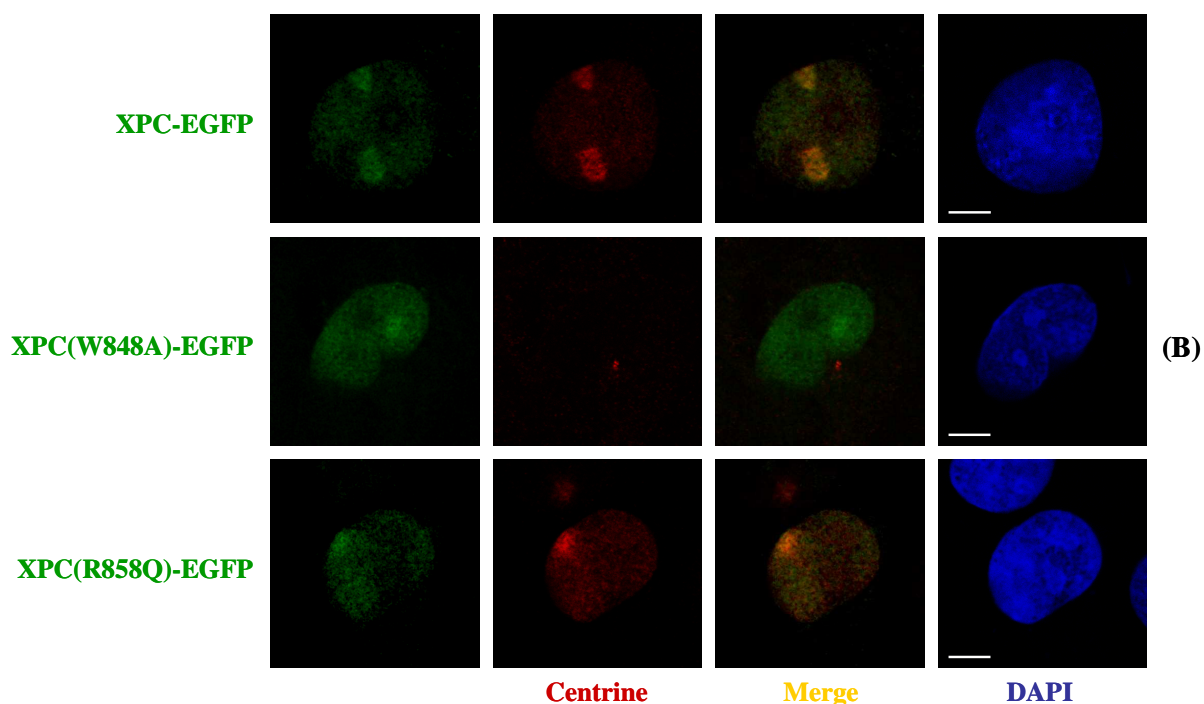


Figure 22. La centrine 2 reste complexée à XPC sur l'ADN endommagé. Les cellules ont été transfectées avec les différentes protéines étiquetées, puis irradiées localement aux UVC (254 nm ; 100 J/m²) 24 heures après transfection. Elles ont ensuite été fixées 10 minutes après l'irradiation (formaldéhyde pour les CPD, méthanol pour la centrine) et marquées par un anti-CPD pour contrôler la présence des lésions (A ; souris : 1/80) ou un anti-centrine (B ; souris : 1/1000). L'ADN est révélé par le DAPI. Barre : 10 µm.

Nous avons observé qu'*in vivo*, la centrine 2 se localisait sur les sites des dommages induits par les UVC. En effet, il y a une forte accumulation de centrine 2 qui colocalise avec les foyers de XPC-EGFP ou XPC(R858Q)-EGFP induits par les UVC. La centrine 2 resterait donc complexée à XPC aux zones endommagées très tôt après l'irradiation. Par contre, la centrine 2 ne se concentre pas aux sites des lésions quand le variant W848A est exprimé. La centrine 2 seule est donc incapable de se focaliser sur les régions lésées. L'interaction entre XPC et la centrine 2 est essentielle pour localiser la centrine 2 sur les dommages de l'ADN.

L'inhibition de l'interaction entre XPC et la centrine 2 ne modifie pas les cinétiques de recrutement de XPC aux photodommages

Le variant pathogène XPC(W690S) peut être visualisé au niveau des lésions après une irradiation localisée sans pouvoir fixer l'ADN endommagé *in vitro* et déclencher le GG-NER

(Yasuda et al, 2007). Ce variant est toujours complexé à Rad23B et à la centrine 2, et son accumulation dans les zones irradiées est dépendante de DDB2. Ceci suggère que dans certains cas, la focalisation d'une protéine variante sur les dommages induits par les UV n'est pas synonyme d'un recrutement rapide et fonctionnel.

Nous avons ainsi souhaité analyser plus précisément l'accumulation de ces variants sur les lésions de l'ADN et établir des cinétiques de recrutement immédiatement après une irradiation. C'est pourquoi nous avons mis au point un micro-irradiateur laser couplé à un microscope confocal en temps réel (voir Matériel et Méthodes). La micro-irradiation laser à 405 nm induit la formation de cassures simple-brin et double-brin, et de dommages de bases sur une zone très fine du noyau de taille constante (176 nm). La durée de l'irradiation est de 1 seconde puis une image est prise toutes les 2, 5 secondes environ. Nous avons ensuite établi des cinétiques de recrutement de protéines fluorescentes en mesurant la différence d'intensité de fluorescence entre le bruit de fond nucléaire et la zone irradiée.

Nous avons tout d'abord vérifié que le variant XPC(W690S)-EGFP s'accumulait au niveau de zones irradiées localement aux UVC (non présenté ; Yasuda et al., 2007). Nous avons ensuite analysé le recrutement de la protéine normale XPC-EGFP et des deux variants XPC(W848A)-EGFP et XPC(W690S)-EGFP suite à la formation de photodommages après l'impact du laser. Sur la figure 23-A sont représentées 3 images pour chaque protéine : une avant et une immédiatement après l'impact du laser (2,5 secondes) puis une image prise 125 secondes après le début de l'expérience, quand un « plateau de recrutement » est atteint (voir figure 23-B). La première image acquise après l'impact montre une zone d'intense blanchiment d'environ 2 μm de diamètre qui n'est plus détectable 10 secondes après. Les protéines étiquetées XPC-EGFP et de XPC(W848A)-EGFP commencent à se concentrer immédiatement après l'irradiation, tout d'abord localement au niveau de l'impact puis elles s'accumulent dans une zone d'environ 1 μm de diamètre. Contrairement à l'observation réalisée 30 minutes après une irradiation localisée aux UVC, le recrutement immédiat du variant XPC(W690S)-EGFP est très faiblement détectable juste après l'impact.

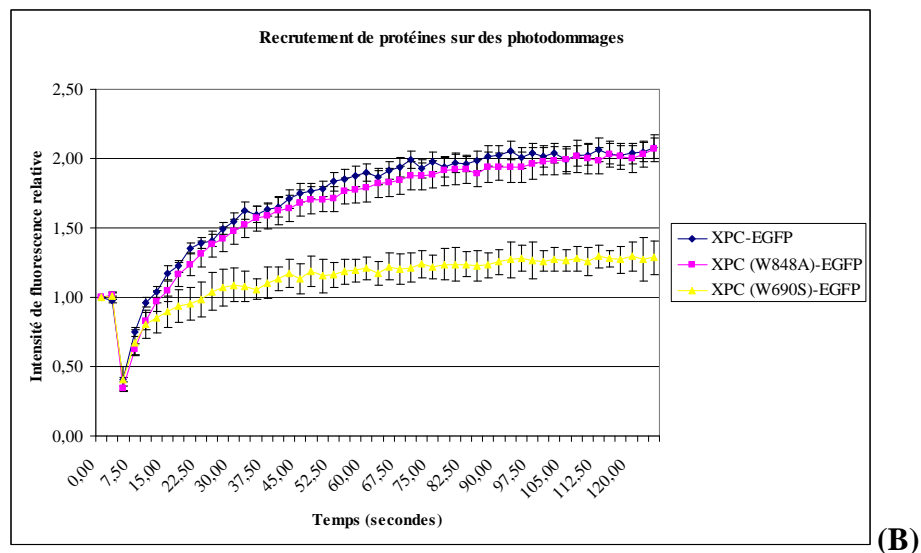
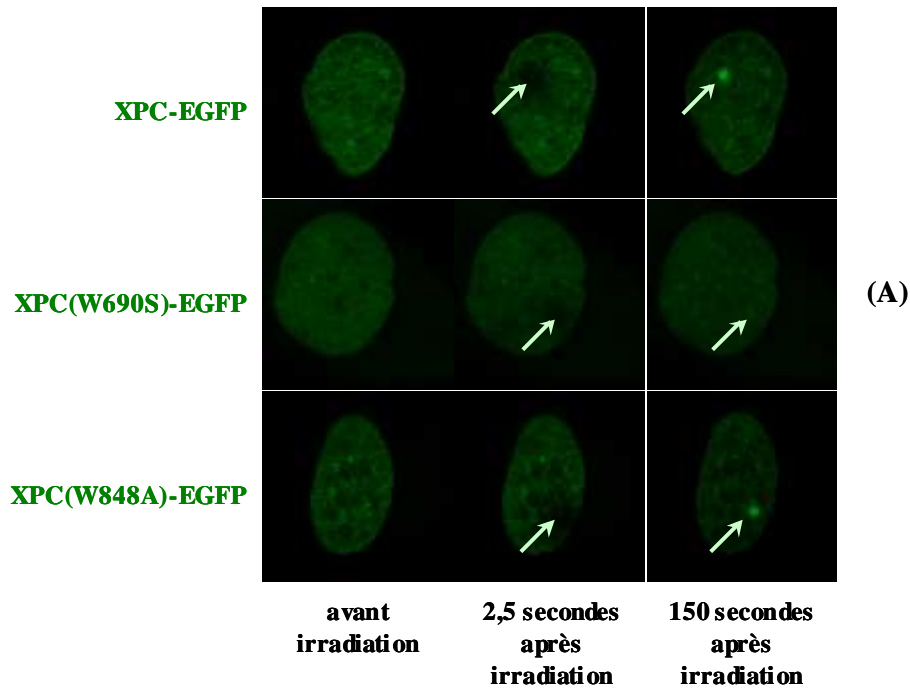


Figure 23. L'accumulation immédiate du variant XPC(W690S) au niveau de l'impact du laser est déficiente. Les fibroblastes ASI ont été transfectés avec les différents plasmides, puis micro-irradiés à 405 nm 24 heures après. La réponse des différentes protéines est visualisée directement par imagerie *in vivo* (A) ou après avoir établi des cinétiques d'accumulation à partir de l'ensemble des images obtenues (B). Pour la quantification de l'intensité de fluorescence au niveau du spot de chaque image, le bruit de fond nucléaire a été déduit de l'intensité de fluorescence au niveau de la zone irradiée.

Les cinétiques de recrutement établies à partir des images enregistrées toutes les 2,5 secondes (figure 23-B) montrent que l'extinction de fluorescence due à l'impact du laser est équivalente pour les trois variants : l'intensité de fluorescence diminue à 0,4. Le recrutement

du variant XPC(W848A)-EGFP suit la même accumulation que la protéine XPC-EGFP. 80 secondes après l'impact ces deux protéines atteignent un plateau d'intensité égale à 2. Le variant XPC(W690S)-EGFP atteint un plateau 50 secondes après l'irradiation à une intensité d'environ 1,25, soit 1,6 fois plus faible que l'intensité maximale détectée avec la protéine normale XPC-EGFP. DDB2 peut donc induire l'accumulation de XPC(W690S) au niveau des zones endommagées 30 minutes après l'exposition aux UVC, mais la reconnaissance immédiate des lésions est défectueuse, ce qui empêchera le recrutement de XPA et TFIIH (Yasuda et al, 2007).

La localisation immédiate du variant XPC(W848A) sur les zones endommagées semble être fonctionnelle. Bien que la centrine 2 puisse augmenter l'affinité de XPC sur l'ADN endommagé *in vitro*, leur interaction ne semble pas être essentielle pour la reconnaissance des lésions *in vivo*. L'efficacité réduite du GG-NER en présence du variant 3A(WLL) (Nishi et al, 2005) pourrait s'expliquer par une déficience à une autre étape que le recrutement de XPC sur les lésions.

Conclusion

XPC et la centrine 2 interagissent *in vivo* dans les noyaux des cellules HeLa, sous la forme d'un complexe stable ancré à la chromatine. La séquence protéique de la centrine 2 ne contient pas de NLS, sa localisation dans le noyau des cellules serait donc dépendante de la présence de XPC. La protéine de fusion XPC-EGFP s'accumule très rapidement sur des photodommages induits à 405 nm : l'existence du complexe XPC/centrine 2 en conditions basales lui permet ainsi d'être recruté immédiatement après la formation des lésions afin de déclencher le GG-NER.

La formation de ce complexe dépend de l'intégrité du résidu W848 de XPC. En effet, un variant XPC(W848A) inhibe l'interaction *in vivo* et ne peut plus induire l'accumulation de la centrine 2 dans le noyau des cellules, ni sa localisation sur les sites des lésions. Par contre ce variant s'accumule aussi rapidement que la protéine normale sur les zones nucléaires endommagées, indiquant que la reconnaissance des lésions *in vivo* peut avoir lieu en absence d'une interaction entre XPC et la centrine 2.

Article 2 : Contributions relatives de XPC, Rad23A, Rad23B et de la centrine 2 dans la réponse cellulaire humaine aux ultraviolets

Présentation et résumé des résultats de l'article

La réponse des cellules humaines aux UV nécessite le déclenchement rapide du NER par l'hétérotrimère XPC/Rad23B/centine 2. Nous avons souhaité évaluer les contributions relatives de chaque élément du complexe dans la réponse cellulaire après une irradiation aux UV. Nous avons utilisé un système de vecteurs pEBVsiRNA développé au laboratoire qui nous a permis d'obtenir dans des cellules HeLa une réduction stable et à long terme de l'expression de XPC, de Rad23A ou de Rad23B (Biard et al, 2005 ; Biard, 2007). Afin de préciser si les protéines Rad23A et Rad23B ont un rôle redondant dans le GG-NER comme chez la souris, nous avons obtenu des lignées cellulaires où les quantités des deux protéines sont réduites. Nous avons analysé la survie cellulaire et la progression du cycle cellulaire après une irradiation aux UVC et aux RI, et nous avons comparé la réparation des lésions induites par les UVC par la technique de réactivation de cellules hôtes. Le rôle de la fraction nucléaire de la centrine 2 est peu connu. Nous avons montré que la surexpression de XPC entraînait une augmentation globale et nucléaire de la centrine 2. Ici, nous avons évalué l'impact de la réduction de l'expression de XPC et des protéines Rad23 sur le niveau basal de la centrine 2 et sa distribution subcellulaire. Nous avons enfin déterminé que seule la présence de XPC était essentielle à la localisation de la centrine 2 sur les sites des dommages induits par les UVC.

La réduction de Rad23B ou XPC entraîne une sensibilisation aux UVC et aux RI

Après obtention de clones exprimant de façon stable les plasmides pEBVsiRNA dirigés contre les différents ARNm, les cellules XPC^{KD} (KD, « Knock-Down) et Rad23B^{KD} présentent environ 80% de réduction des transcrits correspondants et les cellules Rad23A^{KD} montrent plus de 95% de diminution de l'expression du gène. Les double knock-down Rad23A&B^{KD} appelés D^{KD} montrent des réductions d'ARNm similaires aux simples KD. La

transfection de vecteurs EBV-siRNA dirigés contre la centrine 2 s'est avérée toxique pour les cellules, la mortalité à 72 heures étant trop importante pour permettre la sélection de clones et d'effectuer des analyses biochimiques fiables.

La réduction de la quantité de XPC entraîne la plus grande sensibilité des cellules HeLa aux UVC, ce qui confirme les résultats déjà obtenus au laboratoire (Biard et al, 2005 ; Despras et al, 2007). Les cellules Rad23A^{KD} présentent la même sensibilité que les cellules contrôles, alors que les cellules Rad23B^{KD} et D^{KD} ont une sensibilité aux UVC située entre les cellules contrôles et les cellules XPC^{KD}, suggérant que Rad23A ne contribuerait pas particulièrement à la sensibilité des cellules à des faibles doses d'UVC.

Nous avons analysé les modifications du cycle cellulaire de ces différentes cellules par cytométrie en flux après une irradiation aux UVC (10 J/m²) et aux RI (6 Gy). Ces doses fortes de RI sensibilisent en effet les cellules XPC^{KD}, ce qui est corrélé avec une réduction de la réparation des DSB (Despras et al, 2007). Après une irradiation aux UVC, les cellules XPC^{KD} sont bloquées en phase S du cycle cellulaire, indiquant que l'accumulation de lésions non réparées bloque la réplication de l'ADN. Après une exposition aux IR, ces cellules se bloquent majoritairement en phase G2. Les changements de cycle cellulaire observés dans les cellules Rad23B^{KD} et les D^{KD} après traitement aux UV ou aux RI sont proches de ceux observés dans les cellules XPC^{KD}. La réduction de Rad23B et XPC a entraîné des blocages de cycle cellulaire spécifiques, suggérant que Rad23B coopère avec XPC dans la réponse cellulaire à ces deux agents induisant différents dommages. La réduction de Rad23A entraîne peu ou pas de changements dans le cycle cellulaire en comparaison aux cellules contrôles après traitement aux UVC et aux RI, respectivement. Rad23A et Rad23B auraient donc des fonctions différentes dans la réponse cellulaire aux dommages de l'ADN.

Les cellules XPC^{KD} et Rad23^{KD} montrent une réduction de leur activité de réparation de l'ADN viral irradié aux UVC

La réactivation de cellules hôtes (HCR, « Host Cell Reactivation ») a permis de mesurer la réparation d'un ADN viral irradié aux UVC et infecté dans les cellules^{KD} par dosage de l'activité de la β -galactosidase. Cette méthode permet de détecter des variations très

finies d'activité de réparation. Nous avons analysé la capacité de réparation des cellules sans ou 24 heures après un pré-traitement aux UVC. Il a en effet été observé qu'un pré-traitement aux UVC entraînait une augmentation de l'activité de réparation de l'ADN viral, révélant ainsi l'existence de voies de réparation inductibles dans les cellules de mammifères (Rainbow et al, 2003). Ces expériences ont été réalisées en collaboration avec le laboratoire d'A.Rainbow.

Cette méthode nous a permis de montrer que les cellules XPC^{KD} présentaient la plus faible activité de réparation avec ou sans pré-traitement aux UVC, et corrélée à l'hypersensibilité de ces cellules aux UVC. Sans pré-traitement aux UVC, les cellules Rad23A^{KD} et D^{KD} ont un taux de réparation réduit, mais plus important que les cellules XPC^{KD}. Les cellules Rad23B^{KD} ont une activité de réparation légèrement supérieure à celle des cellules contrôle. Toutefois, 24 heures après un traitement aux UVC, les cellules Rad23A^{KD} ont un taux de réparation proche de celui des cellules contrôle alors que les cellules Rad23B^{KD} présentent une activité de réparation réduite. Rad23A pourrait ainsi impliquée dans la capacité de réparation « immédiate » des cellules HeLa alors que la réduction de Rad23B affecterait leur capacité de réparation à plus long terme. Ceci conforte les observations précédentes qui indiquent que Rad23A et Rad23B participeraient à la réponse cellulaire aux dommages de l'ADN de manière différente, la réduction d'une des deux protéines ne pouvant pas être compensée par la présence de l'autre.

mRad23A&mRad23B stabilisant les taux basal et induit par les UV de XPC, nous avons analysé la quantité de protéine dans les différentes cellules^{KD}, avant et après irradiation aux UVC. La quantité de XPC analysée par Western blot n'est pas affectée dans les cellules non irradiées. Par contre, le taux de XPC augmente 24 heures après une irradiation aux UVC dans toutes les cellules mais cette accumulation est significativement plus faible dans les cellules Rad23B^{KD} et D^{KD}, indiquant que Rad23B pourrait stabiliser XPC en réponse aux UVC. Nous avons conclu que ces résultats étaient corrélés aux données de réparation par HCR : Rad23B affecterait uniquement le taux de XPC induit par les UV, réduisant ainsi la capacité de réparation des cellules Rad23B^{KD} après un pré-traitement aux UVC.

La réduction de la quantité de XPC modifie le niveau basal et la distribution subcellulaire de la centrine 2

La quantité des ARNm de centrine 2 et Rad23A sont réduites de 60% ($p < 0,05$) uniquement dans les cellules XPC^{KD}. Le niveau de la protéine centrine 2 est également diminué. Nous avons confirmé que XPC et la centrine 2 étaient présents dans des fractions chromatiniennes. Quand la concentration de XPC est réduite, la fraction centrosomale de la centrine 2 diminue et la fraction nucléaire n'est plus détectable. Ces résultats suggèrent que la centrine 2 est incapable de se localiser dans le noyau des cellules en absence de XPC. La diminution de XPC affecte donc le niveau basal de transcrits et de protéines centrine 2 et perturbe sa localisation subcellulaire.

La centrine 2 est localisée aux zones nucléaires endommagées dans les cellules Rad23^{KD}

La centrine 2 est recrutée aux sites des lésions induites par les UVC, certainement complexée à XPC. En effet quand la quantité de XPC est réduite, la centrine 2 n'est plus localisée sur les zones irradiées. Le complexe XPC/centrine 2 est localisé sur les zones endommagées dans toutes les cellules Rad23^{KD}, suggérant que les protéines Rad23 participent de manière modérée à l'initiation du NER dans les cellules HeLa. Une autre protéine centrosomale, la γ -tubuline, ne colocalise pas avec XPC sur les dommages induits par les UVC. La centrine 2 resterait donc complexée à XPC après la formation de lésions sur l'ADN.

Conclusion de l'article

Nous avons montré que les protéines Rad23 participaient modérément au recrutement du complexe XPC/centrine 2 sur les dommages de l'ADN dans les cellules HeLa. Toutefois, suite à une exposition aux UVC, la réduction de Rad23B sensibilise les cellules aux UVC et elle entraîne une diminution de la concentration de XPC induite après une exposition aux UVC. Ceci est corrélé à une réduction de la capacité de réparation des cellules Rad23B^{KD} 24 heures après un pré-traitement aux UVC. Ces résultats suggèrent que la quantité de XPC

stabilisée après une exposition aux UV joue un rôle déterminant pour la survie cellulaire à long terme. Bien que la réduction de Rad23A n'entraîne pas de sensibilité à des faibles et fortes doses d'UVC, elle diminue la capacité des cellules non irradiées à réparer l'ADN viral, indiquant que Rad23A pourrait avoir un rôle dans la réparation de l'ADN indépendant de XPC. Les réponses des différentes cellules Rad23^{KD} se sont révélées différentes et les résultats obtenus avec les cellules D^{KD} indiquent qu'une des deux protéines ne peut pas compenser l'absence de l'autre au moins dans les expériences effectuées. Les protéines Rad23 humaines, contrairement à celles de la souris, auraient donc des rôles distincts ou partiellement redondants dans la réponse cellulaire humaine aux UV.

Nous avons confirmé que XPC et la centrine 2 formaient un complexe ancré à la chromatine en absence d'irradiation. La centrine 2 resterait complexée à XPC au moins 10 minutes après une irradiation aux UVC. Quand l'expression de XPC est réduite, la quantité totale de centrine 2 est diminuée, affectant aussi bien sa distribution dans le centrosome que dans le noyau des cellules. XPC pourrait faire partie d'un système de régulation du niveau basal de la centrine 2. En son absence, les fonctions nucléaires et centrosomales de la centrine 2 pourraient ainsi être altérées, affectant la réponse des cellules XPC^{KD} aux UV et la division cellulaire.

Differential contribution of XPC, Rad23A, Rad23B and centrin 2 to the UV-response in human cells

Emilie Renaud¹, Nathalie Zacal², Denis S. Biard¹, Constantin T. Craescu³, Andrew Rainbow²
and Jaime F Angulo^{1*}

¹Laboratoire de Génétique de la Radiosensibilité, Institut de Radiobiologie Cellulaire et Moléculaire, CEA, Commissariat à l'Energie Atomique, Direction des Sciences du Vivant, B.P. 6, 92265, Fontenay aux Roses, France

²Department of Biology, McMaster University, Ontario L8S 4K1, Canada

³Integrative Imaging Unit, INSERM U759/Institut Curie-Recherche, Centre Universitaire Paris-Sud, Bâtiment 112, 91405 Orsay, France

Running title: Interaction centrin2/XPC

Keywords: carcinogenesis, centrosome, NER, NHEJ, XPC, RAD23B, centrin 2, DNA recognition, UV-response.

*To whom correspondence should be addressed. Tel. 33 1 46 54 89 19; Fax: 33 1 46 54 87 34;

E-mail: jaime.angulo-mora@cea.fr

SUMMARY

Physical agents like ultraviolet or ionizing radiation activate several hundred genes and proteins in human cells in order to restore cell homeostasis. Among all the pathways contributing to this response, Nucleotide Excision Repair (NER) is unique in restoring the nucleotide sequence of DNA molecule without generating mutations. The primary step of NER is mediated by a protein complex composed by XPC protein, Rad23B, a member of the ubiquitination system and centrin 2, an EF-hand calcium binding protein. These three proteins are multifunctional and participate in other important biochemical transactions. We illustrate the use of Epstein Barr Virus-derived plasmids carrying sequences coding for small interfering RNA (pEBVsiRNA) to stably introduce NER defects in HeLa cells for a long period of time. XPC knock down highlights that XPC plays an essential role in normal cell growth, DNA repair, mutagenesis and cell survival after irradiation. Rad23A and Rad23B participate to DNA repair and cell survival after UVC irradiation with diverging functions. Interestingly, silencing of XPC, Rad23B genes also induce important changes in cell cycle progression after UVC- or γ -irradiation. XPC-silenced cells display the maximal effect compared to the other silenced genes as determined by the repair capacities of these cells. Our data indicate also that the complex XPC/centrin 2 is recruited onto nuclear damaged areas within seconds after irradiation and suggest that XPC plays an essential role in shuttling centrin 2 into the nucleus. XPC gene silencing inhibits the nuclear shuttling of centrin 2 outlining that its recruitment onto damaged sites is XPC-dependent. Furthermore, the inhibition of XPC expression correlates with decreased amount of centrin 2 transcripts and protein, indicating that XPC is required for the fine tuning of centrin 2 gene expression. Because the reduction of centrin 2 concentration in XPC knock down cells affects both centrosomal and nuclear centrin 2 localization, we assumed that XPC could indirectly slow down the cell division.

INTRODUCTION

The genotoxic damage provoked by diverse physical or chemical agents in human cells activates a complex response. Several hundred genes and proteins participate to this response thus contributing to rapidly restore essential cellular functions (Herrlich et al., 2008). Sun radiation, particularly the UV components UVA (320–400 nm) and UVB (280–320 nm) induces the formation of cyclobutane pyrimidine dimers (CPD) and pyrimidine(6,4)pyrimidone adducts (6,4-PP) in human skin DNA. Solar radiation is by far the most important environmental carcinogenic factor (Douki et al., 2003; Mouret et al., 2008). Fortunately, most of the UVC (200–280 nm) are absorbed by the atmospheric ozone and does not arrive onto earth's surface. Among all the pathways contributing to eliminate sun-induced damage, Nucleotide Excision Repair (NER) is the only one able to remove bulky DNA distortions and to restore the initial nucleotide sequence. Dysfunction of recognition and removal of these lesions are associated with severe disorders in humans, including xeroderma pigmentosum (XP), a hereditary disease characterized by a high photosensitivity and a 2,000-fold increase of sunlight-induced skin cancers (Cleaver, 2005; Hanawalt et al., 2003). The NER pathway can be divided into two interrelated sub pathways: (1) transcription coupled repair (TCR) which preferentially removes DNA damage at a faster rate from the transcribed strand of actively transcribed genes and (2) global genome repair (GGR) which removes these adducts from throughout the genome. The two sub pathways differ only in the initial recognition step of NER. Detection of the bulky adduct is facilitated by the XPC and XPE (p48; DDB2) proteins in GGR, whereas the RNAPolII, CSA and CSB proteins are responsible for this step in TCR. The XPC and XPE proteins are inducible by pre-UVC-treatment of cells through a p53 dependent upregulation leading to an enhancement in the GGR pathway (Hanawalt, 2002). XPC is essential to recognize DNA distortions and to recruit other repair factors, including TFIIH (Riedl et al., 2003; Uchida et al., 2002; Volker et al., 2001).

Rad23A and Rad23B, the human homologues of Rad23 from *Saccharomyces cerevisiae*, are also associated with the XPC protein thus stimulating GGR (Sugasawa et al., 1996). In whole cell extracts, all XPC binds to Rad23B (van der Spek et al., 1996), whereas only trace amounts copurifies with Rad23A (Araki et al., 2001). However, only a minority of Rad23A and Rad23B binds to XPC, suggesting that both proteins have additional functions (Sugasawa et al., 1997). The tight association between XPC and Rad23B increases binding on DNA

distortions (Sugasawa et al., 1996). During the repair of CPD, XPE (DDB2) is thought to be the first factor that binds to CPD. XPC/Rad23B is postulated to recognize DDB2 bound to DNA and presumably replaces it at the lesion (Hwang et al., 1999). In mouse cells, mRad23 proteins are functionally redundant for the repair process and for the control of protein degradation by stabilizing XPC and maintaining its basal level. In their absence, XPC is degraded *via* the 26S/proteasome (Ng et al., 2003). In human cells, several studies suggest that the roles of Rad23 proteins are not totally redundant. Short-term silencing that led to a 60% reduction of their expression indicates that both are required for GGR (Hsieh et al., 2005). They also interact differentially with the proteasome and ubiquitinated proteins, indicating that they have distinct roles in the regulation of protein degradation (Chen and Madura, 2006). Thus, differential and relative contributions to cellular metabolism are not fully understood.

The purification of XPC/Rad23B complex from HeLa nuclear extracts revealed a third component, named centrin 2, which is also involved in GGR (Araki et al., 2001). The heterotrimer XPC/Rad23B/centrin 2 is crucial in recognizing structurally different DNA distortions and in initiating GGR (Maillard et al., 2007). Centrins are small acidic proteins, highly conserved in eukaryotes from yeast to human (Salisbury, 1995; Schiebel and Bornens, 1995). Centrins bind Ca^{2+} ions with high affinity ($\sim 10^5 \text{ M}^{-1}$) and belong to the large calmodulin (CaM) super-family of Ca^{2+} -binding proteins. They are traditionally associated with essential structures responsible for nucleating microtubules, like microtubule organization centers (MTOCs), called centrosome in mammals. Three centrins have been identified so far in human cells. Centrin 1 exhibits a tissue-specific expression and is involved in ciliogenesis whereas centrin 2 and centrin 3 are ubiquitously expressed and have a critical role in the centrosome cycle (Middendorp et al., 2000; Paoletti et al., 2003; Salisbury et al., 2002; Sanders and Salisbury, 1994). Only 10% of the total cellular amount of centrin 2 is localized in the centrosome. The remaining is distributed in a more diffuse manner in other organelles or cell compartments suggesting different functional roles (Paoletti et al., 1996). The interaction with the nuclear centrin 2 fraction enhances the affinity of XPC/Rad23B for DNA distortions (Nishi et al., 2005). This interaction is mediated by a high affinity centrin 2-binding site located between amino acids N847 and R863 in the C-terminal part of XPC (Popescu et al., 2003). The 17-mer peptide corresponding to this sequence shows a high affinity for centrin 2 in the presence of the Ca^{2+} ($\sim 10^8 \text{ M}^{-1}$), which decreases 20-fold in its absence. Among three important amino acids required for this interaction (W848, L851 and

L855) (Yang et al., 2006a; Yang et al., 2006b), the W848 residue appears to be critical (Charbonnier et al., 2007; Charbonnier et al., 2006; Thompson et al., 2006). The *Arabidopsis thaliana* centrin 2 (AtCEN2) interacts with the *Arabidopsis* homolog of human XPC by its C-terminal Ca^{2+} -binding domain (Liang et al., 2006) indicating a role in the repair process (Molinier et al., 2004). These data indicate the existence of a similar NER regulatory mechanism throughout the eukaryotic kingdom.

Here, we used different Epstein Barr Virus-derived plasmids carrying sequences coding for small interfering RNA (pEBVsiRNA) to stably introduce NER defects in HeLa cells. The pEBVsiRNA plasmids allow establishing cell lines carrying few copies of plasmid per cell and stably expressing a siRNA even after two years of culture. We have already characterized cell lines exhibiting very low levels of either XPA or XPC proteins; displaying UVC-sensitivity and presenting an impaired UDS (Biard et al., 2005). Here, we compared human cells lines displaying reduced expression of XPC, Rad23A, Rad23B and both Rad23A&B. Silencing of XPC gene led to the most important decrease in cell survival after UVC-irradiation. We report that silencing of XPC and Rad23 genes induce important changes in cell cycle progression after UVC- or γ -irradiation. XPC-silenced cells display the maximal effect compared to the other silenced genes as determined by the repair capacities of these cells evaluated by host cell reactivation (HCR). Additionally, silencing of Rad23A or B differentially affect cell survival and HCR, indicating that Rad23A and Rad23B are not functionally redundant in human cells. HeLa cells silenced for XPC displayed a decreased concentration of centrin 2 RNA and protein. This reduction in centrin 2 protein is detectable in the nucleus and in the centrosome. We show that centrin 2 is recruited onto UVC-damaged sites only in the presence of XPC. mRNA amount of Rad23A is also reduced in XPC^{KD} cells. We discuss the idea that XPC contributes to regulate the expression of genes involved in different aspects of cell metabolism, like cell division and protein degradation thus contributing to the UV- response and to decreased HCR of XPC^{KD} cells.

RESULTS

Characterization of human cells displaying reduced expression of XPC, Rad23A, Rad23B and Rad23A&B.

We sought to determine the biological effects provoked by a decreased expression of XPC, Rad23A, Rad23B and Rad23A&B genes in HeLa cells. We therefore silenced for a long time the expression of these genes using stable pEBV-based siRNA vectors already described (Biard et al., 2005). After transfection, the silenced HeLa cells were isolated and cloned. We observed that XPC or Rad23B silencing triggered a dramatic decrease in cell growth few days after transfection (Biard, 2007; Biard et al., 2005). In contrast, no such decrease was observed after silencing of XPA and Rad23A genes or even after knocking down the expression of Rad23A in cells already silenced for Rad23B gene.

Several commercial antibodies tested against Rad23A and B failed to detect these proteins by immunocytochemistry and western blot. Therefore we assessed the amount of the corresponding transcripts by quantitative PCR (qPCR) as described in M&M. The amount of XPC and Rad23B mRNAs was 20 % compared to control cells in all the clones silenced for these genes (Figure 1). Rad23A^{KD} cells exhibited less than 5 % of the amount of Rad23 mRNA detected in control cells. Double silenced HeLa cells named here Rad23A&B^{KD} displayed a reduction in mRNAs concentration very similar to that observed in the single knock down, indicating that the reduction rate is relatively stable (Figure 1).

Rad23B^{KD} and Rad23A&B^{KD} HeLa cells are sensitive to UVC treatment.

To check whether these decreases in targeted mRNA were functionally relevant, we determined the UVC sensitivity of different HeLa silenced cells by clonogenic survival assays after UVC irradiation. As control, we used the well-documented pBD650 plasmid that carried an impaired shRNA sequence with two insertions in the guide (*antisense*) strand of the hairpin structure. HeLa cells stably transfected with the pBD650 plasmid were termed "HeLa control cells". The UVC exposure required to reduce the survival of cells to 37% (D_{37} value) was systematically assessed from the survival curves for each cell line used and normalized with the value of control cells. Results of a representative clonogenic cell survival experiment are shown in Figure 2A, and D_{37} values (\pm standard error) are summarized in Table 1 for three independent experiments. Control HeLa cells exhibited a constant and elevated survival after

UVC irradiation which was comparable with the survival observed in other DNA repair proficient human cells. As expected, XPC^{KD} HeLa cells displayed a dramatic sensitivity to UVC as previously reported (Biard et al., 2005). While Rad23B^{KD} and Rad23A&B^{KD} cells displayed a moderate sensitivity to UVC, Rad23A^{KD} cells showed a small, but significant increased resistance to UVC compared to control HeLa cells. These observations suggested that Rad23A gene alone did not contribute to UVC sensitivity of HeLa cells and that silencing of the Rad23A gene did not further impair UVC sensitivity even after Rad23B gene silencing. Note that in this experiment we systematically analyzed the efficiency of gene silencing imposed by EBV vectors by qPCR. These analyses revealed an exceptionally stable gene silencing over time. In the particular case of XPC^{KD} cells, the silencing remained efficient for more than two years of culture as judged by qPCR and immunocytochemistry (data not shown).

Significant changes of cell cycle progression after irradiation of Rad23B^{KD} and Rad23A&B^{KD} HeLa cells.

XPC-silenced HeLa cells are unable to properly repair DSBs by NHEJ and present a G1 early S arrest 20 h after UVC irradiation (Biard, 2007; Despras et al., 2007). We thus examined whether the damage produced by ultraviolet or ionizing radiation (IR) could block DNA replication in HeLa cells silenced for XPC, Rad23A, Rad23B or in cells double silenced for Rad23A&B. Cells were irradiated at 6 Gy of IR or at 10 J/m² of UVC. After 16 hours they were fixed, stained with propidium iodide and the distribution patterns of dividing cells in the different phases of the cycle determined by flow cytometry. Mock treated silenced and control cells presented a very similar distribution pattern indicating that knock down of these genes does not modify *per se* the cell cycle (Figure 2-B, left column from top to bottom).

After UVC-irradiation control HeLa cells accumulated in the G2/M phases of the cell cycle in comparison to non irradiated cells. We assumed that DNA lesions were efficiently repaired and did not affect DNA replication (Figure 2-B, compare top left and middle columns). UVC-irradiated Rad23A^{KD} cells displayed a pattern similar to UVC-irradiated control HeLa cells. HeLa XPC^{KD} cells exhibited a S-phase arrest, likely induced by remaining unrepaired DNA lesions (Biard et al., 2005). In Rad23B^{KD} and Rad23A&B^{KD} cells, UVC-irradiation induced a clear accumulation in S phase of the cell cycle compared to irradiated control HeLa cells. This data further confirm that silencing of Rad23A or Rad23B genes induce a different response to UVC irradiation. Rad23B^{KD} cells could not replicate properly their damaged DNA whereas

Rad23A^{KD} did. As expected, IR also produced different effects. HeLa control and Rad23A^{KD} cells presented a moderate G2 arrest after IR corresponding to remaining damaged cells (Figure 2-B). XPC^{KD}, Rad23B^{KD} and Rad23A&B^{KD} cells displayed a major G2 arrest indicating that these silenced cells do not tolerate acute doses of IR. The cell cycle modifications of Rad23A&B^{KD} HeLa cells were very similar to those of Rad23B^{KD} and XPC^{KD} cells and were different to those detected in Rad23A^{KD} cells. Considering that this was also the case after UVC-irradiation, we concluded that the roles played by Rad23A and B in response to the damage produced by these two physical genotoxic agents are different and non-overlapping. Cellular responses to genotoxic stress of Rad23B^{KD} cells are closer to XPC^{KD} cells, indicating that Rad23B could cooperate in the repair processes of bulky lesions and DSB.

Silencing of Rad23A gene in HeLa cells decreased their DNA repair efficiency as evidenced by a host cell reactivation assay

The intracellular concentration of XPC protein, mutagenesis and cancer are clearly correlated (Khan et al., 2004). However, the contribution of human Rad23A and Rad23B genes to DNA repair and mutagenesis deserves further characterization. We sought to determine the influence of silencing the GG-NER XPC, Rad23A, Rad23B genes on the DNA repair capacity of HeLa cells. Consequently, we chose a sensitive HCR approach to detect small differences in DNA repair capacity of silenced cells (Ghodgaonkar et al., 2008; Kassam and Rainbow, 2007). We monitored the recovery of a β -galactosidase reporter gene after infection of silenced cells with mock- or UVC-irradiated Ad5HCMVsp1*lacZ* adenoviral particles as described recently (Pitsikas et al., 2007). In order to determine if UVC irradiation of cells may contribute to enhance HCR, in some experiments cells were UV-irradiated 24 hours before infection as described in M&M. Results of a representative experiment showing the relative β -galactosidase activity 24 h after infection with non-treated or UVC-irradiated Ad5HCMVsp1*lacZ* are shown in Figure 3. Similar results were obtained when β -galactosidase activity was assayed at 40-44 h after infection (data not shown). The UVC exposure to virus required to 37% decrease in β -galactosidase activity, or D_{37} value, was extrapolated from the relative β -galactosidase activity curves for each cell line and the D_{37} value obtained in the HeLa silenced cell lines relative to that in the HeLa control cells was determined for each experiment. Average D_{37} values \pm standard error and average relative D_{37} values \pm standard error compared to HeLa control cells are shown in Table 1 for nine

independent experiments. We observed that XPC^{KD} HeLa cells presented the lowest recovery of β -galactosidase activity as compared with HeLa control cells. These data are in accordance with the information obtained by clonogenic survival and cell cycle analysis discussed above (Figures 2-A and 2-B).

In parallel, we determined the β -galactosidase activity of the UVC-damaged reporter gene in XPC deficient XP44RO cells and in XP44RO cells complemented with XPC cDNA (Masson et al., 2003). XP44RO cells poorly repaired the UVC-damaged adenoviral DNA of the *lacZ* reporter gene compared to XP44RO cells complemented with XPC cDNA. The β -galactosidase activity of the enzyme encoded by the UVC-damaged reporter gene in XP44RO cells was comparable to that observed in XPC silenced HeLa cells. After introduction of XPC cDNA, the β -galactosidase activity of the UVC-damaged reporter gene was similar to that detected in NER proficient primary human skin fibroblasts (data not shown).

We detected a significant increase in expression of the UV-damaged reporter gene in Rad23B^{KD} untreated cells compared to HeLa control cells (Figure 3-A). In addition, Rad23A^{KD} and the moderately UVC sensitive Rad23A&B^{KD} untreated cells showed a decrease in expression of the UV-damaged reporter gene compared to HeLa control cells (Figure 3-A, Table 1). These data indicate that a decrease in Rad23B expression did not decrease the repair of UVC-induced DNA damage in untreated HeLa cells. In contrast, a reduction of Rad23A expression resulted in a significant decrease in repair of the UVC-damaged reporter gene in untreated HeLa cells. Strikingly, irradiation with UVC of Rad23^{KD} cells 24 hours prior to infection led to enhanced HCR in Rad23A^{KD} cells whereas the repair capacity of Rad23B^{KD} cells was reduced. HCR of irradiated Rad23A&B^{KD} cells was similar to irradiated Rad23B^{KD} cells (Figure 3-B), indicating that the double knock down cells reflect well the individual contribution to each gene to DNA repair. These results further highlight that Rad23A and Rad23B participate in different ways to the repair of UVC-induced DNA damage.

The relative amount of XPC protein is reduced following UVC exposure of Rad23B^{KD} compared to HeLa control cells.

In human cells, genotoxic agents up-regulate the XPC protein in a p53 dependent manner (Fitch et al., 2003; Hanawalt et al., 2003). Because HeLa cells are known to possess an impaired p53 pathway, we checked whether the expression of the XPC protein after UVC was impeded in either control or knock down HeLa cells. Cells were irradiated with 9 J/m² UVC

or left untreated, harvested 6 and 24 hours later and whole cell protein extracts were analysed by Western blot. Actin detection was used as loading control. Representative results from a single experiment are shown in Figure 4. The XPC band intensity was analyzed using spot densitometry and the values obtained were corrected for the background and then normalized to the internal standard, β -actin. Pooled results of three independent experiments are shown in Table 2 for the relative amount of XPC protein in the HeLa silenced compared to the HeLa control cells for untreated cells (6h) (column 2) and cells 24 h after UVC treatment (column 3). In addition we show the relative amount of XPC protein in UVC treated cells at 24 compared to 6 h after treatment (column 4).

24 hours after UVC irradiation, the amount of XPC protein increased in control, XPC^{KD}, Rad23A^{KD}, Rad23B^{KD} and Rad23A&B^{KD}. The increase in XPC protein was greatest in the HeLa control and lowest in the Rad23B^{KD} and Rad23A&B^{KD} cells, although these differences were not significant. As expected, the amount of XPC protein was substantially reduced in XPC^{KD} compared to HeLa control cells for both untreated and UVC-treated cells (Figure 4, Table 2). Of considerable interest was our finding that the relative amount of XPC protein in Rad23B^{KD} compared to HeLa control cells was significantly different in untreated compared to UVC-treated cells ($P=0.00304$). In untreated cells the amount of XPC protein in Rad23B^{KD} relative to HeLa control was increased (1.10 ± 0.09), whereas in UVC treated cells the relative amount of XPC protein was decreased (0.69 ± 0.11).

Our results suggest that Rad23B acts to stabilize/protect the XPC protein in UVC-treated HeLa cells, but not in untreated cells and it is the amount of XPC protein stabilized after UVC exposure that determines cell survival. We conclude that the failure to stabilize XPC in Rad23B^{KD} cells may explain the HCR decrease observed in pre-irradiated cells.

XPC-silenced HeLa cells display low levels of centrin 2 protein.

Since we lack information about the nuclear distribution of centrin 2, we sought to know whether the reduction of XPC protein concentration could affect the basal concentration of centrin 2. We first confirmed that reduced XPC mRNA concentration observed in XPC^{KD} cells led to a clear decrease in XPC protein concentration in XPC^{KD} HeLa cells. The analysis of other silenced HeLa cells displaying a constitutive concentration of XPC protein that presented relatively small variation as judged by Western blot (Figure 5-A). The detection of α -tubulin indicated that similar amount of total proteins from different extracts were loaded and analyzed on membrane using anti-XPC antibodies (Figure 5-A). We

observed that XPC^{KD} cells systematically presented decreased amounts of centrin 2 protein and mRNA (around 60%; see Figures 1 and 5). The mRNA level of Rad23A was also reduced in these cells. These data suggest that XPC protein may be involved in the regulation of the basal amount of centrin 2 protein. Since we have previously shown that the nuclear fraction of centrin 2 directly interacts with XPC through a well defined protein motif (Charbonnier et al., 2007), we sought to confirm the XPC-mediated nuclear internalization of centrin 2 by fractionation of cellular proteins and Western blot detection as reported (Rapic-Otrin et al., 2002). The proteins present in whole cell extracts (called WCE) were compared to cytoplasmic and nuclear proteins. Two fractions (supernatants S2 and STM) contained cytoplasmic proteins, the fractions TW and LS were composed of nucleoplasmic soluble proteins, while three other fractions (0.3, 0.5 and 2) corresponded to chromatin-bound nuclear proteins extracted at different NaCl concentrations (Rapic-Otrin et al., 2002). We used as control α -tubulin which was observed in S2 and STM fractions but never in nuclear fractions (Figure 5). In opposition, γ -tubulin was detected in S2, STM and in the nuclear fraction 0.3. XPC protein was mainly detected in the 0.3 and 0.5 fractions in control HeLa cells indicating that the great majority of protein resides in the nucleus, bound to the chromatin (Figure 5-A). Centrin 2 was detected both in the cytoplasm (S2 and STM fractions) as well as in the nucleus, further confirming the immunocytochemical observations (Figure 5-A). In control HeLa cells, the centrin 2 was detected in nuclear fractions 0.3 and 0.5, showing a distribution very similar to that of the XPC protein. These data suggests that in the absence of a genotoxic stress, XPC and centrin 2 are altogether tightly associated to the chromatin. Under the same experimental conditions, total extracts of HeLa XPC^{KD} cells displayed a clear decrease in XPC protein concentration. Note that under our experimental conditions we failed to detect XPC among the nuclear proteins of HeLa XPC^{KD} cells (not shown). Under the very same conditions, centrin 2 protein concentration decreased in whole cell extracts and cytoplasmic fractions of HeLa XPC^{KD} cells and was undetectable in nuclear compartments (Figure 5-A). Distribution of γ -tubulin was not changed. Cellular fractionation of all Rad23^{KD} cells did not affect amount or distribution of XPC or centrin 2 (data not shown). These data fit well with the decrease in centrin 2 mRNA in XPC^{KD} cells quantified by q-PCR (Figure 1) and indicate that XPC gene silencing correlates with a low cellular amount of centrin 2, both in the nucleus and cytoplasm.

Silencing of XPC gene leads to changes in the subcellular distribution of XPC and centrin 2 proteins.

Since XPC gene silencing modifies the centrin 2 expression levels (Figure 5-A), we checked whether this may lead to changes in the subcellular distribution of these proteins. Silenced and control HeLa cells were analyzed by immunocytochemical detection. Cells seeded on cover slips and harvested within the exponential growth phase were fixed for 3 minutes at -20°C in cold methanol to allow detection of centrin 2 and γ -tubulin. The XPC protein was detected essentially in the nucleus (Figure 5-B). This pattern was in agreement with those previously published (Errabolu et al., 1994; Ng et al., 2003; Charbonnier et al., 2007; Paoletti et al., 1996; Santagati et al., 2001). The only exception was the pattern detected in XPC^{KD} HeLa cells in which XPC and centrin 2 staining intensity concomitantly decreased compared to the signal detected in control cells or in HeLa cells (Figure 5-B and not shown). In control HeLa, Rad23A^{KD}, Rad23B^{KD} and Rad23A&B^{KD} cells, the anti-centrin 2 antibody produced a strong signal in the centrosome together with a weaker perinuclear staining and a slight and dispersed fluorescence signal in the cytoplasm and the nucleus (Figure 5-B). Centrin 2 protein appeared to be localized in a perinuclear domain as well as through the cytoplasm as a dispersed signal. The perinuclear staining likely reflects the strong interaction of centrin 2 with nucleoporins previously reported (Resendes et al., 2008). In HeLa XPC^{KD} cells, the nuclear staining due to centrin 2 was barely detectable and the fluorescence was also slightly reduced in the centrosomes (Figure 5-B). We concluded that the weak XPC staining, due to XPC-gene silencing, correlates with the low centrin 2 expression. This idea is coherent with the 60% decrease in centrin 2 mRNA observed in XPC^{KD} HeLa cells by q-PCR (Figure 1). The results confirm that lowered XPC expression strongly affects cellular amount and distribution of centrin 2 both in the nucleus and centrosome. Hence, the reduction of XPC protein level could affect regulation of cell division in response to DNA damage.

Centrin 2 protein relocates onto nuclear damaged sites in a XPC-dependent manner.

XPC like other NER proteins migrates to the nuclear UV-damaged areas within 5 minutes after irradiation (Katsumi et al., 2001; Mone et al., 2001; Ng et al., 2003). Does centrin 2 protein accompany XPC in this transaction? We answered this question by creating intranuclear discrete UV-damage and immunocytochemical staining. We detected the recruitment of XPC protein onto damaged zones 10 minutes after UVC-irradiation at 100 J/m^2 (Figure 5-B). Under these conditions, the centrin 2 staining was particularly concentrated in the nuclear

damaged regions. The centrin 2 and XPC staining patterns were very similar indicating a nearly perfect overlap (Figure 6-A). These data indicate that the XPC/centrin 2 complex is recruited onto damaged sites during the very earliest steps of GGR. These observations strongly support that there is a coordinated expression of these two proteins after UVC-irradiation. The centrin 2 relocalization onto nuclear damaged regions was also detected in Rad23A^{KD}, Rad23B^{KD}, Rad23A&B^{KD} and control HeLa cells suggesting that it may be independent of the two Rad23 proteins (Figure 6-A). Under the same conditions, the immunocytochemical detection of γ -tubulin produced a clear centriolar signal in all silenced cells which did not relocalize onto damaged nuclear regions (Figure 6-B). The local UVC-irradiation of these silenced HeLa cells at 100 J/m² provoked at least two types of DNA lesions: CPD and 6,4-PP as judged by the immunocytochemical detection using antibodies directed against these lesions (Figure 6-C). UVC-irradiation at 9 J/m² of whole HeLa silenced cells did not induce a massive relocalization of cytoplasmic centrin 2 into the nucleus 10 minutes, 6 and 24 hours later (data not shown). We conclude that the presence of CPD and 6,4-PP contributes to the relocalization of the XPC and centrin 2 onto damaged nuclear regions.

DISCUSSION

Genotoxic agents elicit a complex response in human cells by directly modifying proteins, nucleic acids or (ribo)nucleoprotein complexes. These primary targets activate several intermediates and signal transduction pathways depending on the type of genotoxic agent.

A human nearly syngeneic XP-model based on RNA interference.

The UV component of solar radiation induces CPDs and 6,4-PPs in human skin DNA (Cadet et al., 2005; Douki et al., 2003; Mouret et al., 2008). These DNA distortions activate several intermediates and signal transduction pathways. One of them is the heterotrimer XPC/Rad23B/centrin 2 which performs the crucial, damage-sensing step within GGR. The evaluation of the contribution of each monomer in GGR is difficult because they are multifunctional proteins that participate in other important physiological processes. Human cells established from XP patients and deficient for genes involved in GGR may help to circumvent these difficulties. However, these cells are experimentally difficult to obtain and

their genetic backgrounds are different. Beside some phenotypes are difficult to study because there are no naturally occurring mutant, such as for Rad23A and Rad23B genes. To cope with this problem we created a set of NER deficient human cells. Numerous DNA repair genes, such as NER ones, have been silenced for several years using pEBVsiRNA plasmids. The obtained cell lines mimic the phenotype of cells derived from XP patients. Until now, more than 50 different human silenced cell lines in HeLa genetic background and in other human cells types have been obtained. Note that silencing of a given gene produce a similar phenotype in different cell types (Biard, 2007; Biard et al., 2005; Despras et al., 2007). As expected genes coding for crucial multifunctional proteins involved in vital physiological processes are difficult to silence for a long term. In our experiments, in spite of several attempts, we failed to obtain HeLa cells with reduced expression levels of centrin 2. Inhibition of centrin 2 expression leads to cell death within three days after transfection (not shown). This observation is consistent with previously reports indicating an important role for centrin 2 in centriole duplication, cell division and mRNA import-export (Resendes et al., 2008; Salisbury et al., 2002,). This was also the case for Ku70 gene in which gene silencing leaded to cell death within 15 days of selection after transfection (Biard, 2007).

In contrast, long term gene silencing for XPC, Rad23A, Rad23B and Rad23A&B (double mutant) genes in HeLa cells leads to an mRNA amount which is less than 20% of the amount present in control HeLa cells. This result differ with the 60 and 50 % reduction reported by Hsieh et al. after transient inhibition of Rad23A and Rad23B gene expression (Hsieh et al., 2005). siRNA-expression plasmids enhance gene silencing during long periods compared to oligonucleotides, as previously reported (Biard and Angulo, 2007).

Gene silencing modifies cell sensitivity to physical genotoxic agents.

XPC knock down in HeLa cells strongly increase UVC-sensitivity and decrease normal growth rate. This is consistent with XPC involvement in several nuclear transactions including several DNA repair pathways and also signal transduction (Araki et al., 2001; D'Errico, 2006); Masson et al., 2003; (Shimizu et al., 2003). An increasing number of recent reports further support the idea that XPC is a multifunctional protein (Despras et al., 2007; Frechet et al., 2008; Maillard et al., 2007; Nahari et al., 2004). It is noteworthy that HeLa are highly malignant cells harbouring the E6 gene of HPV which strongly inhibits the p53-dependent response to genotoxic stress which controls XPC induction. However, under our experimental conditions, HeLa cells are NER proficient as determined by *in vitro* NER assay

(Biggerstaff and Wood, 2006). Furthermore, p53-trapping does not affect XPC protein recruitment on UV-induced localized DNA lesions in HeLa cells (Figure 6-A). Our results agrees with the idea that small remaining amounts of p53 that are not trapped by E6 protein may be sufficient to allow some degree of XPC protein transactivation and participation in NER after UVC irradiation. It has also been suggested that GGR efficiency may depends on cell differentiation rather than the status of p53 (Ferguson and Oh, 2005). Under our conditions, XPC recruitment onto damaged regions in HeLa cells is comparable to that detected in normal human fibroblasts and is not detectable in XPC-deficient cell lines.

Long-term silencing of Rad23B or Rad23A&B genes provokes a UVC-sensitivity intermediate between that of control HeLa cells and the more sensitive HeLa XPC^{KD} cells. In contrast UVC-sensitivity of HeLa Rad23A^{KD} is similar to that of control HeLa cells. The short-term transient inhibition of these human genes result in reduced repair of UVC-induced DNA damage similar to that reported here (Hsieh et al. 2005). These results contrast with the normal UVC survival and normal GGR and TCR of mouse embryo fibroblasts (MEFs) derived from mRad23A or mRad23B knock out mice. These MEFs differ only in the reduced rate of repair of 6,4-PP observed in mRad23B KO cells. Therefore mRad23B gene fully compensate mRad23A deficiency, but mRad23A gene cannot completely compensate for loss of mRad23B (Ng et al., 2002; Okuda et al., 2004). Rad23A KO mice possess a quasi-normal phenotype and Rad23B KO mice present an impaired embryonic development and high rates of intrauterine death in indicating an important role for development in addition to its involvement in DNA repair (Ng et al., 2003).

The differences between the human and mouse cells may be explained by the fact that various NER factors in yeast, mouse and humans are different although the main features of NER are well conserved from yeast to humans (Hanawalt, 2002). It must also be considered that stable knock down of a given gene decreases mRNA concentration to less than 20% compared to parental cells whereas in mouse knock out the expression is completely abolished.

Physical genotoxic agents modify the cell cycle of silenced cells.

Acute UVC or IR reveal clear cell cycle modifications only in particular silenced HeLa cells (Biard, 2007; Despras et al., 2007). These relatively quick changes, rather exceptional, are illustrated here for HeLa XPC^{KD} and HeLa Rad23B^{KD} cells which modify their cell cycle in response to UVC and IR indicating a delay in DNA replication. These changes fit well with the clear decrease in clonogenic survival of HeLa XPC^{KD} and HeLa Rad23B^{KD} cells

determined 15 days after UVC irradiation. The fact that Rad23A^{KD} cells present a clonogenic survival similar to that observed in control cells further confirms that they are able to replicate DNA. Interestingly, HeLa XPC^{KD} and Rad23B^{KD} cells respond to acute IR with a very similar modification of the cell cycle. Since silencing of XPC in HeLa cells correlates with a reduction of DSB repair (Despras et al., 2007), it could be tempting to speculate that both proteins cooperate in this response. The cell cycle modifications observed in double Rad23A&B silenced HeLa cells are essentially determined by the inhibition of Rad23B further indicating that these Rad23A and Rad23B genes play different roles after genotoxic treatment.

Repair of viral DNA in silenced cells.

HCR confirms that XPC protein plays a major role in both the efficiency and the fidelity of the DNA repair in presence of UVC-induced DNA lesions. Increased concentrations of XPC protein improved HCR (data not shown), further confirming that the amount of XPC protein is a limiting factor in the cellular response to UVC. The fact that a decreased XPC protein concentration is followed by a concomitant decrease in centrin 2 and Rad23A mRNA and a reduced HCR efficiency (Figures. 1 and 3) suggests a coordinated regulation of these three genes for an adaptative response to UVC. A decrease in Rad23A gene expression, but not in Rad23B, inhibits HCR in untreated cells, further indicating that in human cells the functions of Rad23 genes are only partially redundant in DNA repair. Rad23A appears to be required for the efficiency of the NER process although not essential for the global response to UVC. Considering that Rad23A stabilizes some ubiquitinated proteins and controls degradation of several targets (Chen and Madura, 2006; Glockzin et al., 2003) and on the other hand that centrin 2 is a crucial factor of centriole duplication (Salisbury et al., 2002), we conclude that XPC protein may regulate the constitutive expression of proteins involved in distinct functions in cellular metabolism reinforcing the toxic affect of a UVC irradiation. Interestingly enough, in baker yeast, Rad4 (XPC orthologue) binds to Rad33 (structurally similar to the yeast centrine Cdc31, the orthologue of human centrin 2) through the same residues required for the interaction of XPC with centrin 2 (den Dulk et al., 2008). The disruption of the Rad4/Rad33 interaction results in an intermediate UV-sensitivity that is epistatic with NER similar to the UV-sensitivity of the *rad33* mutant. These data point to a functional interaction conserved from yeast to humans.

Rad23B does not participate in viral repair in untreated cells whereas in irradiated cells it contributes to HCR. This can be explained by the fact that Rad23B acts to stabilize/protect the XPC protein in UVC-treated cells. This is also consistent with a decrease in long term sensitivity to UVC irradiation in Rad23B^{KD} cells. Interestingly, reduction of Rad23A or Rad23B expression does not alter neither the amount nor the stability of XPC protein in untreated cells. Rad23 proteins contain an ubiquitin-like (Ubl) N terminal and two ubiquitin-associated (UBA) domains (van der Spek et al. 1996) suggesting a link to the ubiquitin/proteasome-mediated protein degradation pathway. Rad23A and Rad23B interact with the S5A subunit of the 26S proteasome, and Rad23A serves as a substrate for E6-associated protein-mediated ubiquitination (Kumar et al., 1999). Using mRad23A and mRad23B knockout mouse embryo fibroblasts (MEF), Ng et al. reported that the mHR23 proteins function in NER by governing XPC stability via partial protection against proteasomal degradation and NER-type damage further stabilizes XPC and thereby enhances repair (Ng et al., 2003). Reduction of Rad23A or Rad23B expression do not alter the subcellular distribution of XPC protein in untreated cells but Rad23B stabilizes XPC protein in UVC-treated HeLa cells. This suggests that Rad23B regulates differentially XPC in human and mouse cells.

Recruitment of XPC and centrin 2 onto damaged DNA.

There are repair proteins, like DDB1 and XPA, that are localized in the cytoplasm or both in the nucleus and in the cytoplasm (Liu et al., 2000; Rademakers et al., 2003). After UV irradiation they migrate from the cytoplasm into the nucleus. We show here that centrin 2 protein also resides both in the cytoplasm and the nucleus. Under our experimental conditions, centrin 2 and XPC are distributed in the same chromatin fractions (Figure 5-A) although the nuclear fraction of centrin 2 does not bind directly DNA (Nishi et al., 2005). Furthermore, we failed to detect a UVC-induced centrin 2 migration into the nucleus. We conclude that XPC and the nuclear fraction of centrin 2 exist as a complex bound to the chromatin. This idea is further supported by the facts that a reduction in XPC expression correlates with the nuclear exclusion of centrin 2 in HeLa cells, and that XPA deficient cells recruit centrin 2 onto damaged nuclear regions (not shown). We show here for the first time that XPC and centrin 2 are recruited onto damaged sites in all Rad23 silenced cells we tested suggesting that the presence of centrin 2 and p48 is sufficient to initiate the GGR process. Although Rad23B protein is required for the *in vitro* stimulatory effect of centrin 2 in the NER assay (Araki et

al., 2001), its expression inhibition does not prevent the *in vivo* localization of XPC and centrin 2 onto DNA damaged zones, suggesting a limited effect on the XPC/centrin 2 complex recruitment in HeLa cells.

We hypothesize that the interaction between XPC and centrin 2 facilitates the subsequent steps of NER. This idea is on line with the previous *in vitro* finding of Nishi et al., that in the absence of the interaction XPC/centrin 2 lead to reduced repair. We showed that the *in vivo* interaction between centrin 2 and XPC is essential for the nuclear import of centrin 2 (Charbonnier et al., 2007). Our present results indicates that the interaction XPC/centrin 2 may also have other biological consequences related mostly to the proper progression of cell division rather than only linked to DNA-repair processes. The characterization of the dynamic structure of these primary GGR nucleoprotein complexes will be helpful to understand the first steps of repair initiation and will shed some light on the primary mechanisms of radiation induced carcinogenesis.

MATERIALS AND METHODS

Cell culture, treatments and clonogenic cell survival

Human cervical carcinoma HeLa cells were obtained from E. May (Villejuif, France). Cells were maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) supplemented with 10% fetal calf serum (FCS), 100 U/ml penicillin and 100 mg/ml streptomycin, under 5% CO₂. HeLa XPC^{KD}, Rad23A^{KD} and Rad23B^{KD} were previously described (Biard, 2007). Double knock-down cells were obtained after transfection of one HeLa Rad23B^{KD} clone (hygromycin-resistant) with a pEBVsiR23A-puromycin plasmid (pBD897). Transfected cells were propagated in culture in the presence of puromycin (0.3 µg/µL; CalbioChem) and hygromycin B (125 µg/mL; Invitrogen). 6 clones were analyzed by qPCR. In order to determine cell survival, cells were irradiated at 254 nm using the indicated UVC doses or with a ¹³⁷Cs γ-ray source (IBL 637, CisBio International, Gif-sur-Yvette, France) at a dose rate of 1.9 Gy/min.

For clonogenic cell survival, 500 cells were plated in 60 mm dishes 24 hours before UVC or mock-treatment. Two weeks later, clones were fixed with 4% paraformaldehyde and stained with methanol/PBS/methylene blue. Clones were counted; each point represents the mean of three culture dishes. Colony formation was normalized as a percentage of mock-treated cells.

Local irradiation was performed essentially as described (Mone et al., 2001; Katsumi et al., 2001), cells were seeded on glass coverslips. 70% confluent cells were washed with PBS and UV irradiated through a polycarbonate filter (Millipore, Billerica MA) with pores of 5 μ m. After 10 minutes at 37°C, cells were fixed for 15 minutes with 4% formaldehyde at room temperature and permeabilized for 5 minutes with 0.5% triton X-100, or fixed for 3 minutes with cold methanol at -20°C and further processed for immunofluorescence. In some HCR experiments cells were seeded and 6 hours later UVC- (or mock) irradiated at 9 J/m². 24 h later they were infected and HCR was determined as above with mock or UVC-irradiated virus and scored for b-gal 12 h later (Panel B).

Real time–quantitative polymerase chain reaction (qPCR).

The concentration of XPC, centrin 2, Rad23A, Rad23B and β -actin transcripts were determined by real time quantitative RT-PCR, using the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method reported (Livak and Schmittgen, 2001). The mRNAs purified from 1 million cells were extracted with RNA Plus kit (QIAGEN, GmbH, Germany). Total RNA, 1 μ g, was mixed in a final volume of 14 μ L with 100 ng of random primer and 10 nmole of dNTPs. RNAs were first incubated at 65°C for 5 minutes. 6 μ L of a mix containing 4 μ L of 5X first strand buffer, 1 μ L of 0.1 M DTT and 1 μ L of reverse transcriptase superscript II (Invitrogen, UK) was added to each sample. The mixture was incubated for 5 minutes at 25°C, 50 minutes at 50°C and finally 15 minutes at 70°C. 180 μ L of water was added to each sample and cDNAs were stored at -80°C. Primers used for the PCR are: XPC-direct: 5'-TCTTCGGAGGGCGATGAAAC and XPC-reverse: 5'-ATGATGGACAGGCCAATAGC; centrin 2-direct: 5'-ATCTGAAACGCGTGGCCAAG and centrin 2-reverse: 5'-TTCATGATGCGCAGGAAGCTC; Rad23A-direct: 5'-GAACATGCGGCAGGTGATTC and Rad23A-reverse: 5'-TCCTGGTGCCGGCTGATTTG; Rad23B-direct: 5'-ACATCGGGTGATTCTTCTCG and Rad23B-reverse: 5'-GCTCTCAGGGCTGCAATTAC; β -actin-direct: 5'-ACTCTTCCAGCCTTCCTTCC and β -actin-reverse: 5'-GTTGGCGTACAGGTCTTTGC. CDNAs were diluted 1/10 in water, and 4 μ L was mixed with 10 μ L of supermix containing SybrGreen (Invitrogen, UK), 0.4 μ L of each 10 μ M primer and 5.6 μ L of water. PCR was performed with Pgm 7300 system software as followed: 2 minutes at 50°C, 2 minutes at 95°C, 15 seconds at 95°C and 1 minute at 60°C. The last three steps were repeated 40 times and the fluorescence was quantified during each step at 60°C. Relative quantity of each cDNA was determined as: variation of expression = $Q = 2^{-\Delta\Delta C_T}$, $\Delta\Delta C_T = (C_{T,target} - C_{T,actin})^{KD} \text{ cells} - (C_{T,target} - C_{T,actin}) \text{ control cells}$.

Significance of the differences between experimental values measured in control and silenced cells was assessed using the Student test. *P<0.05; **P<0.001.

Cellular fractionation.

Cells treated with trypsin and washed twice with PBS were harvested by centrifugation. Cellular fractionation was performed essentially as described (Radic-Otrin et al., 2002). A fraction of cells was suspended in the equivalent volume of 2X Laemmli buffer yielding the whole cell extract (WCE). Thereafter all the operations were performed at 4°C and all the buffers contained "Complete protease inhibitor cocktail" (Roche, Mannheim, Germany). Remaining cells were lysed in hypotonic buffer (10 mM HEPES, pH 7.9, 10 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂) with Triton X-100 at a final concentration of 0.1 %. After centrifugation at 5000 rpm for 5 minutes, the supernatant, designated as S1, was further centrifuged at 13,000 rpm for 5 minutes. The supernatant, containing cytoplasmic soluble proteins, was named S2. The remaining cytoplasmic proteins were further extracted by washing with isotonic sucrose buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 250 mM sucrose, 5 mM MgCl₂) giving rise to a fraction, called STM. The pellet was extracted in low salt (LS buffer = 10 mM Tris-HCl, pH 7.4, 0.2 mM MgCl₂) supplemented to 1% Triton X-100 final in order to remove the nuclear membrane. This fraction, called Triton Wash (TW) fraction, contained nucleoplasmic soluble proteins. The pellet was washed twice with LS buffer, to yield LS fraction. The remaining proteins were consecutively extracted with LS buffer containing a final concentration of 0.3, 0.5 and 2.0 M NaCl, that give the label of the corresponding fractions.

Western Blot.

For Western Blot analysis, cells were directly lysed in 2X Laemmli buffer and boiled for 10 minutes. Proteins of 10 000 cells were loaded and separated onto an 8 or 12% polyacrylamide gel and transferred onto a nitrocellulose membrane. Membrane was blocked overnight in TBS + 0.1% tween saturated with 5% milk, incubated one hour at room temperature with primary and secondary antibodies diluted in TBS + 0.1 % tween. Antibodies conjugated to horseradish peroxidase were revealed by chemiluminescence (GE-Healthcare, UK). XPC mouse antibodies were directed against the pure C-terminal peptide coded by the sequence 815-940 of the XPC ORF. The polypeptide (700 µg) was injected in three steps intradermally into three mice. Serum collected 20 days after the third injection presented the highest titres and this fraction, named anti-XPC3, was used here (Charbonnier et al., 2007). Rabbit serum was also obtained.

Anti-centrin 2 rabbit serum was obtained from M. Bornens (Institute CURIE, France) and was diluted 1/2000.

Immunofluorescence staining and microscopy

Antibodies were diluted in BSA buffer (0.5 % Tween 20, 12 % BSA and 0.036 % NaN₃). Fixed and permeabilized cells were incubated for one hour at room temperature with primary antibodies, washed three times and further incubated with a labelled secondary anti-mouse antibody. XPC mouse and rabbit antibodies were diluted 1/100 and centrine and γ -tubulin antibodies were diluted 1/1000. 20H5 anti-centrine antibody was a kind gift of Dr J. Salisbury (Mayo Clinic, USA). Secondary antibodies were conjugated to Cy3[™] (Jackson laboratories, Inc., USA) and Alexa 488 (Invitrogen, UK).

For CPD and 6,4-PP detection, cells were fixed with 4% *p*-formaldehyde for 15 minutes and permeabilized with 0.1% triton X-100/PBS for 2*10 minutes. DNA was denaturated for 8 minutes with freshly prepared 0.07 M NaOH/PBS, cells were washed with 0.1% triton X-100/PBS and blocked for 30 minutes at 37°C with 20 % FCS/PBS. Primary antibodies were diluted in 5% FCS/PBS and incubated for one hour at 37 °C. CPD and 6,4-PP antibodies (KTM53 and KTM50, Kamiya Biomedical Company, USA) were diluted 1/80 and 1/40, respectively. Cells were washed and blocked two times with 0.1% triton X-100/PBS and 20% FCS/PBS, respectively. Cy3[™] conjugated antibodies were diluted in 5% FCS/PBS and incubated for 30 minutes at 37°C. Cells were washed another two times with 0.1% triton X-100/PBS.

For both protocols, cells were counterstained with 4',6-diamino-2-phenylindole (DAPI; 4 μ g/mL). Immunofluorescence was detected using a Leica SP5 microscope and images were analyzed with ImageJ program (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>).

Flow cytometry analysis

$0,8 \times 10^6$ cells were seeded 24 hours before treatments in 60 mm dishes, and collected 16 hours after. Cells were fixed in 75% ethanol at 4°C for 24 hours. Cells were washed twice with PBS and nuclear DNA was stained with propidium iodide (4 μ g/mL; Sigma) in the presence of RNase (10 μ g/mL; Sigma) in PBS for at least 30 minutes. Stained cells were analyzed on a FACScalibur (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) using CellQuest software. 10,000 cells gated as single cells using FL2A/FL2W scatter were analyzed.

HCR

Irradiation of the virus by UVC has been described previously (Francis and Rainbow, 1999). Briefly, virus suspensions at 1.6×10^7 plaque forming units (PFU)/ml PBS were irradiated at 4 °C with continuous stirring using a germicidal lamp (GE model G8T5) emitting predominantly at 254 nm with UVC fluences up to 600 J/m^2 at a rate of $1\text{--}2 \text{ J/m}^2/\text{s}$, as determined using a Black-Ray J-255 shortwave UV meter (Ultraviolet Products Inc.). The use of a recombinant adenovirus to examine HCR of the UV-damaged reporter gene has been described previously (Kassam and Rainbow, 2007). Fibroblasts were seeded at a density of 3×10^4 cells/well in 96-well plates (Falcon). Between 12 and 18 h after seeding, media were aspirated and cells were infected with either irradiated or unirradiated virus at a multiplicity of infection (MOI) of 20–40 PFU/cell. Following viral adsorption for 90 min at 37 °C, the cells were incubated with warm growth medium and harvested at 12 and 24 h after infection by incubation with 1 mM chlorophenolred- β -d galactopyranoside (Boehringer-Mannheim) in 0.01 % Triton X-100, 1mM MgCl_2 , and 100 mM phosphate buffer (pH 8.3). Absorbance readings at 570 nm were taken at several times using a 96-well plate reader (EL340 Bio Kinetics Reader; Bio-Tek Instruments). Background readings of β -gal activity for uninfected cells were determined in all experiments and only the readings obtained in the linear range that were twice the background for AdCA35*lacZ* infected cells were included in the β -gal-fluence-response curves.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), the Institut Curie, the French Atomic Energy Commission (CEA) and by an operating grant to AJR from the National Cancer Institute of Canada with funds from the Canadian Cancer Society. We thank F. Cordelières for advice and help on confocal microscopy. M. Bornens and J. Azimzadeh for advise and anti-centrin 2 and α -tubulin antibodies, A. Sarasin for XP44RO and XP44ROc cell lines, J. Salisbury for the 20H5 anti-centrine antibody, C. Creminon and M. Plaisance for obtaining mouse anti-XPC antibodies, E. Sage for advice and generous gift of antibodies against UV lesions. L. Miccoli for experimental advice on protein fractionation, and H. Naegeli for sharing unpublished data, material and several interesting discussions. DB thanks

Electricite de France (EDF) for its financial support. ER benefited from a fellowship of the Commissariat à l'énergie atomique and the Fondation pour la Recherche Médicale.

Abbreviations: NER: Nucleotide Excision Repair; XPC xeroderma pigmentosum group C protein; CPD: cyclobutane pyrimidine dimmers; 6,4-PP: pyrimidine(6,4)pyrimidone.

TABLES

Cell line	D ₃₇ for colony survival (J/m ²)	Relative D ₃₇ for colony survival	D ₃₇ for HCR (J/m ²)	Relative D ₃₇ for HCR
HeLa Control	5.40 ± 0.03 (3)	1	250.5 ± 25.1 (9)	1
hHR23A ^{KD}	6.08 ± 0.12 (3) (a)	1.13 ± 0.18	198.7 ± 17.9 (9)	0.82 ± 0.06 (c)
hHR23B ^{KD}	3.72 ± 0.27 (3) (b)	0.69 ± 0.05	355.9 ± 20.5 (9) (a)	1.52 ± 0.16 (d)
hHR23A&B ^{KD}	4.28 ± 0.10 (3) (b)	0.79 ± 0.02	204.6 ± 12.5 (9)	0.85 ± 0.06 (c)
XPC ^{KD}	2.25 ± 0.17 (3) (b)	0.47 ± 0.03	107.8 ± 14.0 (9) (b)	0.44 ± 0.05 (c)

(a) significantly greater than HeLa control by a two sample independent T-test

(b) significantly less than HeLa control by a two sample independent T-test

(c) significantly less than 1 by a one sample two-tailed T-test.

(d) significantly greater than 1 by a one sample two-tailed T-test.

Table 1. D₃₇ for colony survival after UVC and D₃₇ for HCR of the UVC-treated reporter gene in HeLa-control cells and four HeLa^{KD} clones.

Cell line	Relative XPC protein level in untreated cells	Relative XPC protein level in UVC treated cells	Increase in XPC protein from 6 to 24 h after UVC
HeLa Control	1	1	1.71 ± 0.28 (3)
hHR23A ^{KD}	0.95 ± 0.13 (3)	0.89 ± 0.01 (3)	1.37 ± 0.12 (3) (c)
hHR23B ^{KD}	1.10 ± 0.09 (3) (a)	0.69 ± 0.11 (3) (a)	1.18 ± 0.35 (3)
hHR23A&B ^{KD}	0.95 ± 0.04 (3)	0.63 ± 0.17 (3)	1.26 ± 0.37 (3)
XPC ^{KD}	0.42 ± 0.02 (3) (b)	0.33 ± 0.07 (3)	1.49 ± 0.37 (3)

(a) Significantly different from each other in a paired 2-tailed t-test

(b) Significantly different from one in a 2-tailed one-sample t-test

(c) Significantly different from one in a 1-tailed one-sample t-test

Table 2. XPC protein levels in untreated and UVC-treated HeLa-control cells and four HeLa KD clones. The XPC band intensity from Western blots was analyzed using spot densitometry and the values obtained were corrected for the background and then normalized to the internal standard, β-actin. The “No UVC – 6hr” control cell lysates were run separately from the “9J/m² – 6 and 24 hr” cell lysates and therefore were analysed separately. Shows pooled results quantifying the amount of XPC protein from three independent experiments. The relative amount of XPC protein in the HeLa silenced compared to the HeLa control cells is shown for untreated cells (6h) and cells 24 h after UVC treatment in columns 2 and 3 respectively. In addition column 4 shows the relative amount of XPC protein in UVC treated cells at 24 compared to 6 h after treatment.

FIGURES LEGENDS

Figure 1. Determination of the relative amount of different mRNA in silenced HeLa cells by Quantitative PCR. Cells were harvested during the exponentially phase of growth, RNA purified and the mRNA concentration determined as described in M&M. Relative quantification relates the PCR signal of the target transcript in the control cells (1) to that of silenced cells.

Figure 2: Silencing of certain GG-NER genes decreases cell survival after physic genotoxic stress and modifies cell cycle progression. (A) UVC-sensitivity of HeLa KD cells determined by clonogenic survival. HeLa XPC^{KD}, HeLa Rad23A^{KD}, HeLa Rad23B^{KD}, HeLa Rad23A&B^{KD}, and HeLa control cells were seeded at 500 cells per 6-well plates. After 6 to 8 h, growth media was replaced with phosphate buffered saline (PBS) and cells were exposed to UVC. PBS was then replaced with growth media and cells were incubated for 7 days and plates were scored for colonies of greater than 32 cells. Data points are the average \pm one standard error of 6 determinations for control and 3 determinations for each UVC exposure. This figure shows results of a representative experiment. (B) **Cell cycle modifications in silenced HeLa cells 16 h after UVC or ionizing radiation.** HeLa cells were plated, UVC-irradiated with 10 J/m² or 6 Gy, fixed 16 hours later in ethanol, stained with propidium iodide and analysed by flow cytometry as described in M&M.

Figure 3. HCR of β -gal activity for the UVC-irradiated reporter gene in HeLa cells, (A) without or (B) 24 hours after UVC irradiation. HeLa XPC^{KD}, HeLa Rad23A^{KD}, HeLa Rad23B^{KD}, HeLa Rad23A&B^{KD}, and HeLa control cells were seeded into 96 well plates and 12-24 h later infected with UVC-irradiated or unirradiated Ad5HCMVsp1*lacZ* at 40 plaque forming units per cell. After incubation for 24 h infected cells were scored for β -gal activity by incubation with a solution containing 1 mM of the chlorophenolred β -D-

galactopyranoside. A570 was determined at several times following the addition of the β -gal substrate using a 96-well plate reader. The figure shows representative results for a single experiment. Each point is the average \pm SE of 3 replicates (Figure 3-A). The UV fluence required to reduce the β -gal activity to 37% of that for non-irradiated virus (D37) in each cell line was extrapolated from the relative β -gal activity curves and used as a measure of HCR. Pooled D37 values for each cell line, as well pooled D37 values relative to that for the HeLa control line are shown in Table 1 for β -gal scoring at 24 h after infection. Alternatively, cells were seeded, 6h later they were irradiated (or mock irradiated) using a UVC dose of 9 J/m². After 24 h they were infected with untreated or UVC treated virus and scored for b-gal 12 h later as above (Figure 3-B).

Figure 4. The relative amount of XPC protein is reduced in Rad23B^{KD} following UVC irradiation compared to HeLa control cells. Cells were irradiated with 9 J/m² UVC or left untreated, harvested 6 and 24 hours later and whole cell protein extracts were analysed by Western blot. Actin detection was used as loading control. Representative results of a single experiment are shown. The “No UVC – 6hr” control cell lysates were run separately from the “9J/m² – 6 and 24 hr” cell lysates and therefore were analysed separately. The XPC band intensity was analyzed using spot densitometry and the values obtained were corrected for the background and then normalized to the internal standard, β -actin. Pooled results quantifying the amount of XPC protein from three independent experiments are summarised in Table 2.

Figure 5. (5-A) Detection of XPC, centrin 2 and α -tubulin proteins in total extracts of HeLa silenced cells or after cellular fractionation of proteins.

Detection of XPC, centrin 2 and α -tubulin proteins in total extracts of HeLa silenced cells. Cells were harvested during the exponentially phase of growth. 10 000 cells were lysed

in Laemmli buffer and boiled for 10 min. Denatured proteins were separated by SDS-PAGE, transferred onto a membrane and analysed by immunoblot using anti-XPC (mouse), anti-centrin 2 (rabbit) and anti- α -tubulin (mouse) antibodies diluted to 1/1000, 1/2000 and 1/2000, respectively. A representative image was obtained by chemiluminescence with a light sensitive film is shown.

Fractionation of cellular proteins. Cells were harvested as above. A fraction of cells was treated to obtain the WCE. The other cells were processed as described in M&M to obtain fractions S2 and STM containing cytoplasmic proteins. Then nucleoplasmic soluble proteins were extracted in fractions TW and LS. The chromatin bound proteins were further extracted at 0.3, 0.5 and 2.0 M NaCl. Proteins of 25 000 cells were denatured and analyzed as above. γ -tubulin (rabbit) was diluted 1/2000.

(5-B) Immunocytochemical detection of XPC and centrin 2 proteins in silenced HeLa cells. HeLa cells were harvested during exponential growth. Thereafter cells were fixed and processed as described in M&M using DAPI to reveal DNA (blue colour), anti-XPC mouse serum (1/100) or anti-centrin 20H5 mouse antibody (1/1000) coupled to Cy3 (red), and anti- γ -tubulin rabbit serum (1/1000) revealed by an Alexa 488 secondary antibody (green). Merge image represents superposition of centrin 2 and γ -tubulin staining. Bar : 10 μ m

Figure 6. Immunocytochemical detection of XPC, centrin 2, γ -tubulin, CPDs and 6,4-PPs after local UVC irradiation of silenced HeLa cells. HeLa cells were locally irradiated at 100 J/m² UVC as described in M&M, put back for 10 minutes at 37°C, then fixed in formaldehyde (CPD staining) or in methanol (XPC/centrin or γ -tubulin/centrin staining). **(6-A)** Detection of XPC and centrin 2 was performed with an anti-XPC rabbit serum (1/100) and an anti-centrin 20H5 mouse antibody (1/1000). **(6-B)** Detection of centrin 2 and γ -tubulin **(6-**

C) Detection of CPD (mAb KTM53) and 6,4-PP (mAb KTM50) antibodies were diluted 1/80 and 1/40, respectively. Four different stainings were performed: centrin 2 and XPC (**A**) Detection of centrin 2 and γ -tubulin (**B**) Detection of CPD or 6,4-PP (**C**). DNA was revealed with DAPI. Merge images represent superposition of centrin 2 and XPC (**A**) or centrin 2 and γ -tubulin (**B**) stainings. Bar: 10 μ m.

REFERENCES

- Araki, M., Masutani, C., Takemura, M., Uchida, A., Sugasawa, K., Kondoh, J., Ohkuma, Y., and Hanaoka, F. (2001). Centrosome protein centrin 2/caltractin 1 is part of the xeroderma pigmentosum group C complex that initiates global genome nucleotide excision repair. *J Biol Chem* 276, 18665-18672.
- Biard, D., and Angulo, J. (2007). Long Term RNA Interference: Toward a Set of Isogenic Human Deficient Cells in DNA Repair Genes, Vol Chapter VII, Nova Science Publishers edn, Editors: Breehn R. Landseer).
- Biard, D. S. (2007). Untangling the relationships between DNA repair pathways by silencing more than 20 DNA repair genes in human stable clones. *Nucleic Acids Res* 35, 3535-3550.
- 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 mimick human syndromes: application to NER gene silencing. *Mol Cancer Res* 3, 519-529.
- Biggerstaff, M., and Wood, R. D. (2006). Repair synthesis assay for nucleotide excision repair activity using fractionated cell extracts and UV-damaged plasmid DNA. *Methods Mol Biol* 314, 417-434.
- Cadet, J., Sage, E., and Douki, T. (2005). Ultraviolet radiation-mediated damage to cellular DNA. *Mutat Res* 571, 3-17.
- Charbonnier, J., Renaud, E., Miron, S., Le Du, M., Blouquit, Y., Duchambon, P., Christova, P., Shosheva, A., Rose, T., Angulo, J., and Craescu, C. (2007). Structural, thermodynamic, and cellular characterization of human centrin 2 interaction with xeroderma pigmentosum group C protein. *J Mol Biol* 373, 1032-1046.
- Charbonnier, J. B., Christova, P., Shosheva, A., Stura, E., Le Du, M. H., Blouquit, Y., Duchambon, P., Miron, S., and Craescu, C. T. (2006). Crystallization and preliminary X-ray diffraction data of the complex between human centrin 2 and a peptide from the protein XPC. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun* 62, 649-651.

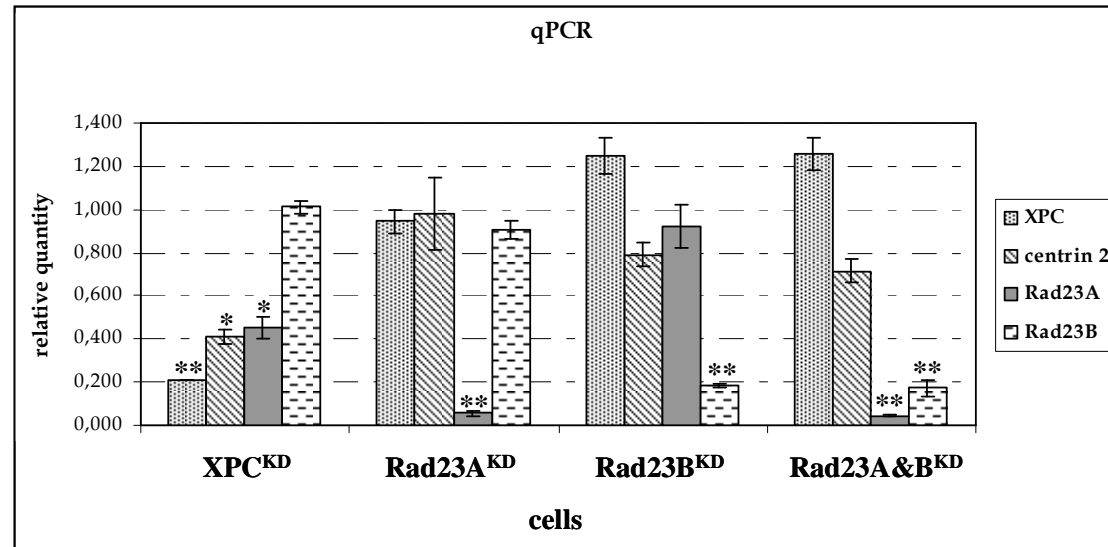
- Chen, L., and Madura, K. (2006). Evidence for distinct functions for human DNA repair factors hHR23A and hHR23B. *FEBS Lett* 580, 3401-3408.
- Cleaver, J. E. (2005). Cancer in xeroderma pigmentosum and related disorders of DNA repair. *Nat Rev Cancer* 5, 564-573.
- D'Errico, M., Parlanti, E., Teson, M., de Jesus, B. M., Degan, P., Calcagnile, A., Jaruga, P., Bjoras, M., Crescenzi, M., Pedrini, A. M., *et al.* (2006). New functions of XPC in the protection of human skin cells from oxidative damage. *Embo J* 25, 4305-4315.
- den Dulk, B., van Eijk, P., de Ruijter, M., Brandsma, J. A., and Brouwer, J. (2008). The NER protein Rad33 shows functional homology to human Centrin2 and is involved in modification of Rad4. *DNA Repair (Amst)* 7, 858-868.
- Despras, E., Pfeiffer, P., Salles, B., Calsou, P., Kuhfittig-Kulle, S., Angulo, J., and Biard, D. (2007). Long-term XPC silencing reduces DNA double-strand break repair. *Cancer Res* 67, 2526-2534.
- Douki, T., Reynaud-Angelin, A., Cadet, J., and Sage, E. (2003). Bipyrimidine photoproducts rather than oxidative lesions are the main type of DNA damage involved in the genotoxic effect of solar UVA radiation. *Biochemistry* 42, 9221-9226.
- Errabolu, R., Sanders, M. A., and Salisbury, J. L. (1994). Cloning of a cDNA encoding human centrin, an EF-hand protein of centrosomes and mitotic spindle poles. *J Cell Sci* 107 (Pt 1), 9-16.
- Ferguson, B. E., and Oh, D. H. (2005). Proficient global nucleotide excision repair in human keratinocytes but not in fibroblasts deficient in p53. *Cancer Res* 65, 8723-8729.
- Fitch, M., E. Cross, I. V. and Ford, J. M. (2003). p53 responsive nucleotide excision repair gene products p48 and XPC, but not p53, localize to sites of UV-irradiation-induced DNA damage, in vivo. *Carcinogenesis* 24, 843-850.
- Francis, M. A., and Rainbow, A. J. (1999). UV-enhanced reactivation of a UV-damaged reporter gene suggests transcription-coupled repair is UV-inducible in human cells. *Carcinogenesis* 20, 19-26.
- Frechet, M., Warrick, E., Vioux, C., Chevallier, O., Spatz, A., Benhamou, S., Sarasin, A., Bernerd, F., and Magnaldo, T. (2008). Overexpression of matrix metalloproteinase 1 in dermal fibroblasts from DNA repair-deficient/cancer-prone xeroderma pigmentosum group C patients. *Oncogene*.
- Ghodgaonkar, M. M., Zagal, N., Kassam, S., Rainbow, A. J., and Shah, G. M. (2008). Depletion of poly(ADP-ribose) polymerase-1 reduces host cell reactivation of a UV-damaged adenovirus-encoded reporter gene in human dermal fibroblasts. *DNA Repair (Amst)* 7, 617-632.
- Glockzin, S., Ogi, F. X., Hengstermann, A., Scheffner, M., and Blattner, C. (2003). Involvement of the DNA repair protein hHR23 in p53 degradation. *Mol Cell Biol* 23, 8960-8969.
- Hanawalt, P. C. (2002). Subpathways of nucleotide excision repair and their regulation. *Oncogene* 21, 8949-8956.

- Hanawalt, P. C., Ford, J. M., and Lloyd, D. R. (2003). Functional characterization of global genomic DNA repair and its implications for cancer. *Mutat Res* 544, 107-114.
- Herrlich, P., Karin, M., and Weiss, C. (2008). Supreme EnLIGHTenment: damage recognition and signaling in the mammalian UV response. *Mol Cell* 29, 279-290.
- Hsieh, H. C., Hsieh, Y. H., Huang, Y. H., Shen, F. C., Tsai, H. N., Tsai, J. H., Lai, Y. T., Wang, Y. T., Chuang, W. J., and Huang, W. (2005). HHR23A, a human homolog of *Saccharomyces cerevisiae* Rad23, regulates xeroderma pigmentosum C protein and is required for nucleotide excision repair. *Biochem Biophys Res Commun* 335, 181-187.
- Hwang, B. J., Ford, J. M., Hanawalt, P. C., and Chu, G. (1999). Expression of the p48 xeroderma pigmentosum gene is p53-dependent and is involved in global genomic repair. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 424-428.
- Kassam, S., and Rainbow, A. (2007). Deficient base excision repair of oxidative DNA damage induced by methylene blue plus visible light in xeroderma pigmentosum group C fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun* 359, 1004-1009.
- Katsumi, S., Kobayashi, N., Imoto, K., Nagakawa, A., Yamashina, Y., Muramatsu, T., Shirai, T., Miyagawa, S., Sugiura, S., Hanaoka, F., *et al.* (2001). In situ visualization of ultraviolet-light-induced DNA damage repair in locally irradiated human fibroblasts. *J Invest Dermatol* 117, 1156-1161.
- Khan, S. G., Metin, A., Gozukara, E., Inui, H., Shahlavi, T., Muniz-Medina, V., Baker, C. C., Ueda, T., Aiken, J. R., Schneider, T. D., and Kraemer, K. H. (2004). Two essential splice lariat branchpoint sequences in one intron in a xeroderma pigmentosum DNA repair gene: mutations result in reduced XPC mRNA levels that correlate with cancer risk. *Hum Mol Genet* 13, 343-352.
- Kumar S., Talis AL. and Howley PM (1999). Identification of HHR23A as a substrate for E6-associated protein-mediated ubiquitination. *J Biol Chem* 274, 18785-18792.
- Liang, L., Flury, S., Kalck, V., Hohn, B., and Molinier, J. (2006). CENTRIN2 interacts with the Arabidopsis homolog of the human XPC protein (AtRAD4) and contributes to efficient synthesis-dependent repair of bulky DNA lesions. *Plant Mol Biol* 61, 345-356.
- Liu, W., Nichols, A. F., Graham, J. A., Dualan, R., Abbas, A., and Linn, S. (2000). Nuclear transport of human DDB protein induced by ultraviolet light. *J Biol Chem* 275, 21429-21434.
- Livak, K. J., and Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25, 402-408.
- Maillard, O., Camenisch, U., Clement, F., Blagoev, K., and Naegeli, H. (2007a). DNA repair triggered by sensors of helical dynamics. *Trends Biochem Sci* 32, 494-499.
- Maillard, O., Solyom, S. and Naegeli, H. (2007b). An aromatic sensor with aversion to damaged strands confers versatility to DNA repair. *Plos Biol* 5, e79.

- Masson, C., Mena, F., Pinon-Lataillade, G., Frobert, Y., Chevillard, S., Radicella, J. P., Sarasin, A., and Angulo, J. F. (2003). Global genome repair is required to activate KIN17, a UVC-responsive gene involved in DNA replication. *Proc Natl Acad Sci U S A* *100*, 616-621.
- Middendorp, S., Kuntziger, T., Abraham, Y., Holmes, S., Bordes, N., Paintrand, M., Paoletti, A., and Bornens, M. (2000). A role for centrin 3 in centrosome reproduction. *J Cell Biol* *148*, 405-416.
- Molinier, J., Ramos, C., Fritsch, O., and Hohn, B. (2004). CENTRIN2 modulates homologous recombination and nucleotide excision repair in Arabidopsis. *Plant Cell* *16*, 1633-1643.
- Mone, M. J., Volker, M., Nikaïdo, O., Mullenders, L. H., van Zeeland, A. A., Verschure, P. J., Manders, E. M., and van Driel, R. (2001). Local UV-induced DNA damage in cell nuclei results in local transcription inhibition. *EMBO Rep* *2*, 1013-1017.
- Mouret, S., Charveron, M., Favier, A., Cadet, J., and Douki, T. (2008). Differential repair of UVB-induced cyclobutane pyrimidine dimers in cultured human skin cells and whole human skin. *DNA Repair (Amst)* *7*, 704-712.
- Nahari, D., McDaniel, L. D., Task, L. B., Daniel, R. L., Velasco-Miguel, S., and Friedberg, E. C. (2004). Mutations in the Trp53 gene of UV-irradiated Xpc mutant mice suggest a novel Xpc-dependent DNA repair process. *DNA Repair (Amst)* *3*, 379-386.
- Ng, J. M., Vermeulen, W., van der Horst, G. T., Bergink, S., Sugawara, K., Vrieling, H., and Hoeijmakers, J. H. (2003). A novel regulation mechanism of DNA repair by damage-induced and RAD23-dependent stabilization of xeroderma pigmentosum group C protein. *Genes Dev* *17*, 1630-1645.
- Ng, J. M., Vrieling, H., Sugawara, K., Ooms, M. P., Grootegoed, J. A., Vreeburg, J. T., Visser, P., Beems, R. B., Gorgels, T. G., Hanaoka, F., *et al.* (2002). Developmental defects and male sterility in mice lacking the ubiquitin-like DNA repair gene mHR23B. *Mol Cell Biol* *22*, 1233-1245.
- Nishi, R., Okuda, Y., Watanabe, E., Mori, T., Iwai, S., Masutani, C., Sugawara, K., and Hanaoka, F. (2005). Centrin 2 stimulates nucleotide excision repair by interacting with xeroderma pigmentosum group C protein. *Mol Cell Biol* *25*, 5664-5674.
- Okuda, Y., Nishi, R., Ng, J. M., Vermeulen, W., van der Horst, G. T., Mori, T., Hoeijmakers, J. H., Hanaoka, F., and Sugawara, K. (2004). Relative levels of the two mammalian Rad23 homologs determine composition and stability of the xeroderma pigmentosum group C protein complex. *DNA Repair (Amst)* *3*, 1285-1295.
- Paoletti, A., Bordes, N., Haddad, R., Schwartz, C. L., Chang, F., and Bornens, M. (2003). Fission yeast cdc31p is a component of the half-bridge and controls SPB duplication. *Mol Biol Cell* *14*, 2793-2808.

- Paoletti, A., Moudjou, M., Paintrand, M., Salisbury, J. L., and Bornens, M. (1996). Most of centrin in animal cells is not centrosome-associated and centrosomal centrin is confined to the distal lumen of centrioles. *J Cell Sci* 109 (Pt 13), 3089-3102.
- Pitsikas, P., Lee, D., and Rainbow, A. J. (2007). Reduced host cell reactivation of oxidative DNA damage in human cells deficient in the mismatch repair gene hMSH2. *Mutagenesis* 22, 235-243.
- Popescu, A., Miron, S., Blouquit, Y., Duchambon, P., Christova, P., and Craescu, C. T. (2003). Xeroderma pigmentosum group C protein possesses a high affinity binding site to human centrin 2 and calmodulin. *J Biol Chem* 278, 40252-40261.
- Rademakers, S., Volker, M., Hoogstraten, D., Nigg, A. L., Mone, M. J., Van Zeeland, A. A., Hoeijmakers, J. H., Houtsmuller, A. B., and Vermeulen, W. (2003). Xeroderma pigmentosum group A protein loads as a separate factor onto DNA lesions. *Mol Cell Biol* 23, 5755-5767.
- Rapic-Otrin, V., McLenigan, M. P., Bisi, D. C., Gonzalez, M., and Levine, A. S. (2002). Sequential binding of UV DNA damage binding factor and degradation of the p48 subunit as early events after UV irradiation. *Nucleic Acids Res* 30, 2588-2598.
- Resendes, K. K., Rasala, B. A., and Forbes, D. J. (2008). Centrin 2 localizes to the vertebrate nuclear pore and plays a role in mRNA and protein export. *Mol Cell Biol* 28, 1755-1769.
- Riedl, T., Hanaoka, F., and Egly, J. M. (2003). The comings and goings of nucleotide excision repair factors on damaged DNA. *Embo J* 22, 5293-5303.
- Salisbury, J. L. (1995). Centrin, centrosomes, and mitotic spindle poles. *Curr Opin Cell Biol* 7, 39-45.
- Salisbury, J. L., Suino, K. M., Busby, R., and Springett, M. (2002). Centrin-2 is required for centriole duplication in mammalian cells. *Curr Biol* 12, 1287-1292.
- Sanders, M. A., and Salisbury, J. L. (1994). Centrin plays an essential role in microtubule severing during flagellar excision in *Chlamydomonas reinhardtii*. *J Cell Biol* 124, 795-805.
- Santagati, F., Botta, E., Stefanini, M., and Pedrini, A. M. (2001). Different dynamics in nuclear entry of subunits of the repair/transcription factor TFIIH. *Nucleic Acids Res* 29, 1574-1581.
- Schiebel, E., and Bornens, M. (1995). In search of a function for centrins. *Trends Cell Biol* 5, 197-201.
- Shimizu, Y., Iwai, S., Hanaoka, F., and Sugawara, K. (2003). Xeroderma pigmentosum group C protein interacts physically and functionally with thymine DNA glycosylase. *Embo J* 22, 164-173.
- Sugawara, K., Masutani, C., Uchida, A., Maekawa, T., van der Spek, P. J., Bootsma, D., Hoeijmakers, J. H., and Hanaoka, F. (1996). HHR23B, a human Rad23 homolog, stimulates XPC protein in nucleotide excision repair in vitro. *Mol Cell Biol* 16, 4852-4861.
- Sugawara, K., Ng, J. M., Masutani, C., Maekawa, T., Uchida, A., van der Spek, P. J., Eker, A. P., Rademakers, S., Visser, C., Aboussekhra, A., *et al.* (1997). Two human homologs of Rad23 are functionally interchangeable in complex formation and stimulation of XPC repair activity. *Mol Cell Biol* 17, 6924-6931.

- Thompson, J. R., Ryan, Z. C., Salisbury, J. L., and Kumar, R. (2006). The structure of the human centrin 2-xeroderma pigmentosum group C protein complex. *J Biol Chem* *281*, 18746-18752.
- Uchida, A., Sugawara, K., Masutani, C., Dohmae, N., Araki, M., Yokoi, M., Ohkuma, Y., and Hanaoka, F. (2002). The carboxy-terminal domain of the XPC protein plays a crucial role in nucleotide excision repair through interactions with transcription factor IIIH. *DNA Repair (Amst)* *1*, 449-461.
- van der Spek, P. J., Visser, C. E., Hanaoka, F., Smit, B., Hagemeijer, A., Bootsma, D., and Hoeijmakers, J. H. (1996). Cloning, comparative mapping, and RNA expression of the mouse homologues of the *Saccharomyces cerevisiae* nucleotide excision repair gene RAD23. *Genomics* *31*, 20-27.
- Volker, M., Mone, M. J., Karmakar, P., van Hoffen, A., Schul, W., Vermeulen, W., Hoeijmakers, J. H., van Driel, R., van Zeeland, A. A., and Mullenders, L. H. (2001). Sequential assembly of the nucleotide excision repair factors in vivo. *Mol Cell* *8*, 213-224.
- Yang, A., Miron, S., Duchambon, P., Assairi, L., Blouquit, Y., and Craescu, C. T. (2006a). The N-terminal domain of human centrin 2 has a closed structure, binds calcium with a very low affinity, and plays a role in the protein self-assembly. *Biochemistry* *45*, 880-889.
- Yang, A., Miron, S., Mouawad, L., Duchambon, P., Blouquit, Y., and Craescu, C. T. (2006b). Flexibility and plasticity of human centrin 2 binding to the xeroderma pigmentosum group C protein (XPC) from nuclear excision repair. *Biochemistry* *45*, 3653-3663.



Cells/Gene	XPC	Centrin 2	Rad23A	Rad23B
Control	1,000	1,000	1,000	1,000
XPC ^{KD}	0,207±0,01**	0,410±0,032*	0,452±0,053*	1,012±0,029
Rad23A ^{KD}	0,945±0,55	0,979±0,168	0,055±0,010**	0,905±0,040
Rad23B ^{KD}	1,250±0,082	0,789±0,056	0,921±0,098	0,184±0,007**
Rad23A&B ^{KD}	1,260±0,075	0,715±0,055	0,043±0,004**	0,175±0,037**

*p<0,05
**p<0,001

Figure 1-A. Determination of the relative amount of different mRNA in silenced HeLa cells by Quantitative PCR

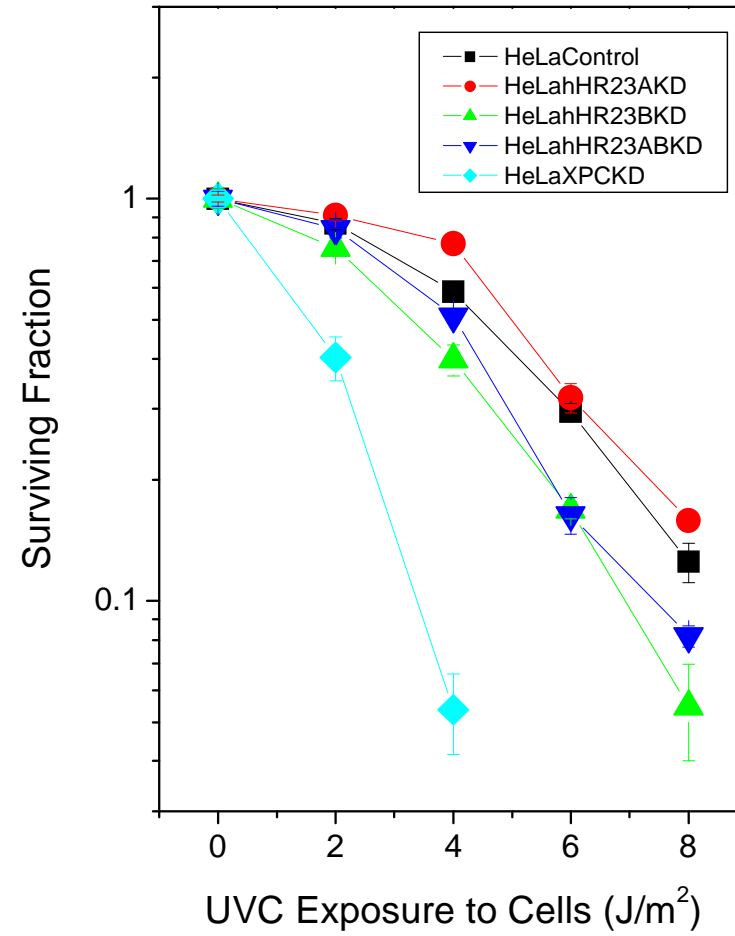


Figure 2(A) UVC-sensitivity of HeLa KD cells determined by clonogenic survival

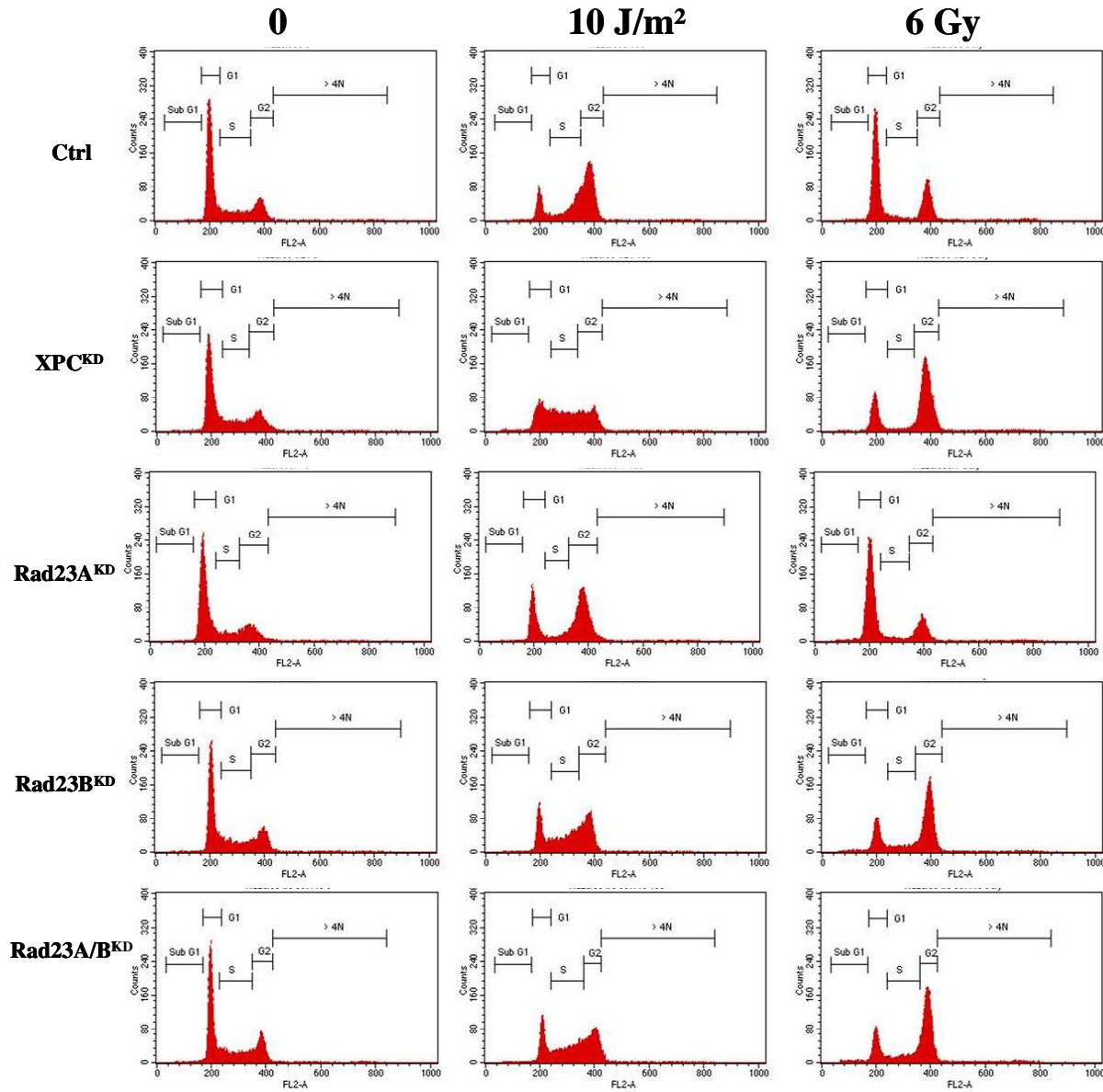


Figure 2 (B). Cell cycle modification in silenced HeLa cells 16 h after UVC or ionizing radiation.

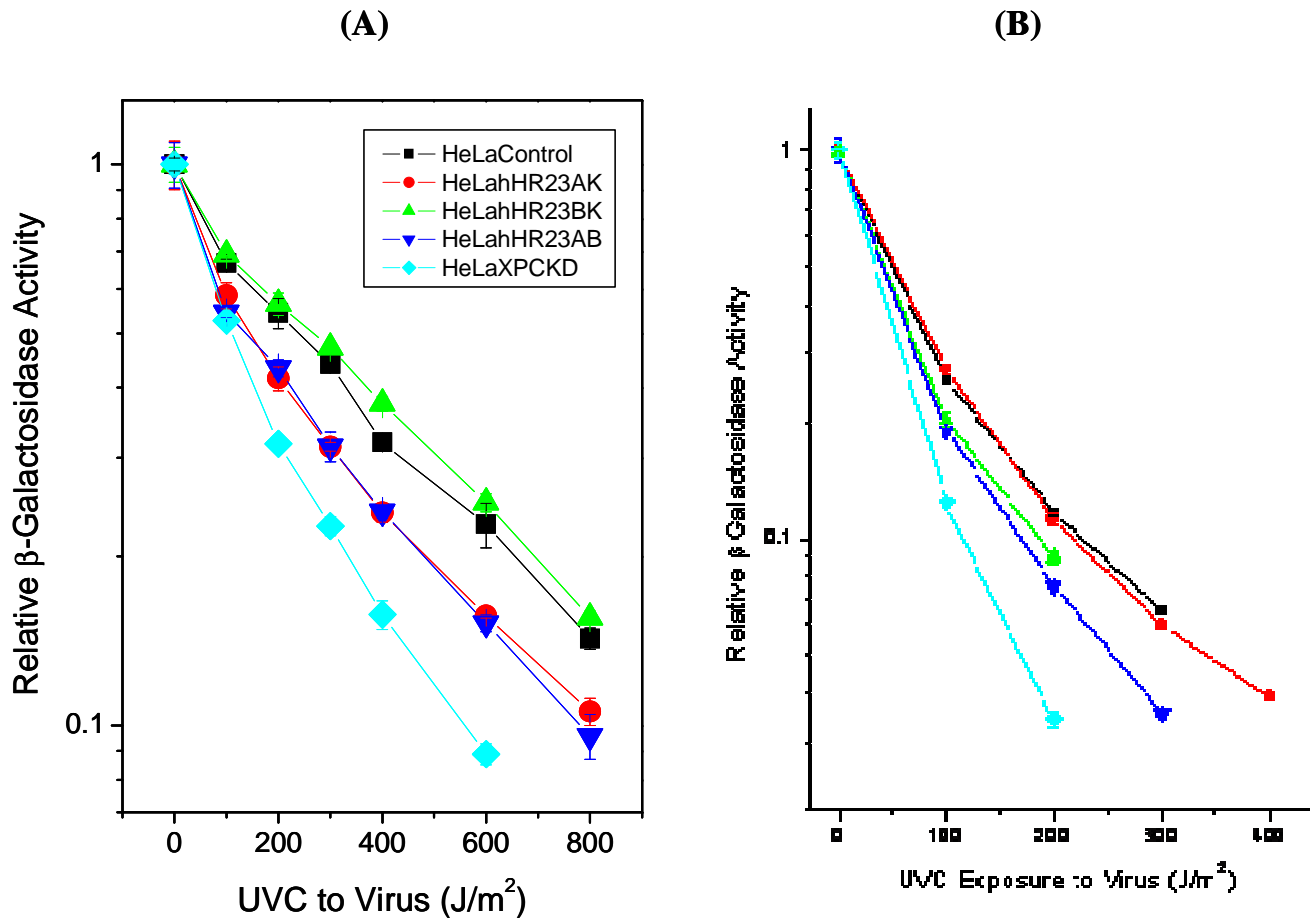


Figure 3. HCR of β -gal activity for the UVC-irradiated reporter gene in HeLa cells, (A) without or (B) 24 hours after UVC irradiation of the cells

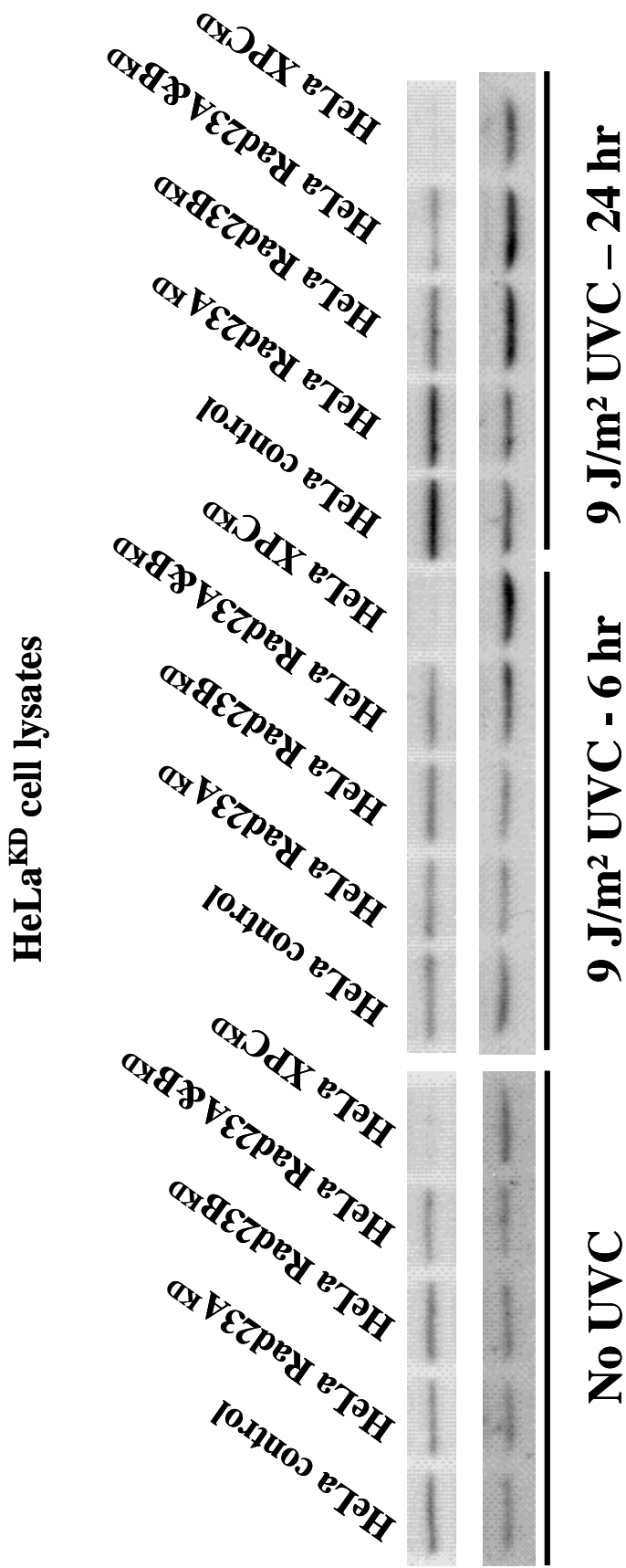


Figure 4. Relative amount of XPC protein in silenced cells following UVC exposure

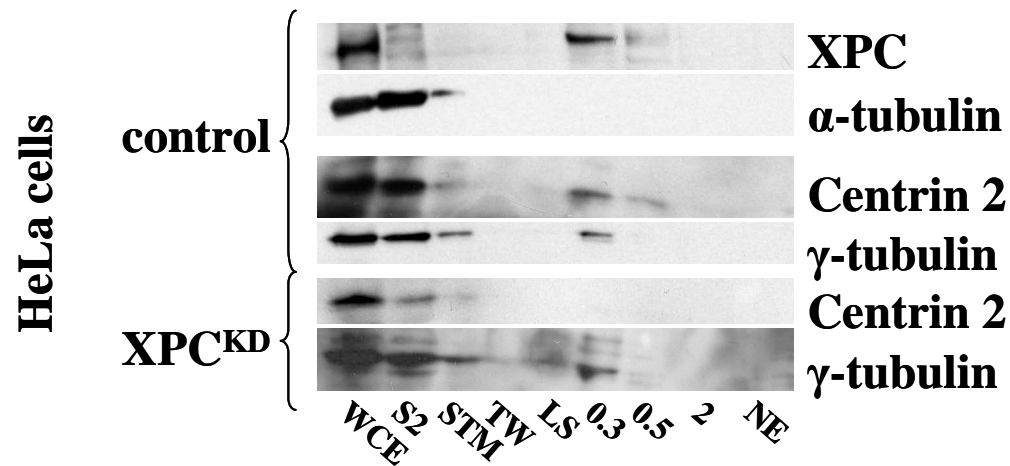
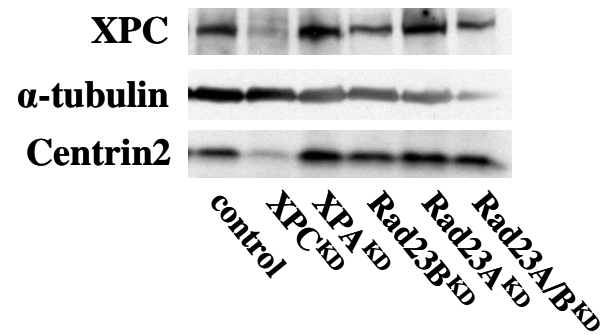


Figure 5 (A). Concentration of XPC, HsCen2 and α -and γ -tubulin proteins in total extracts of HeLa silenced cells or after fractionation of nuclear protein

HeLa cells

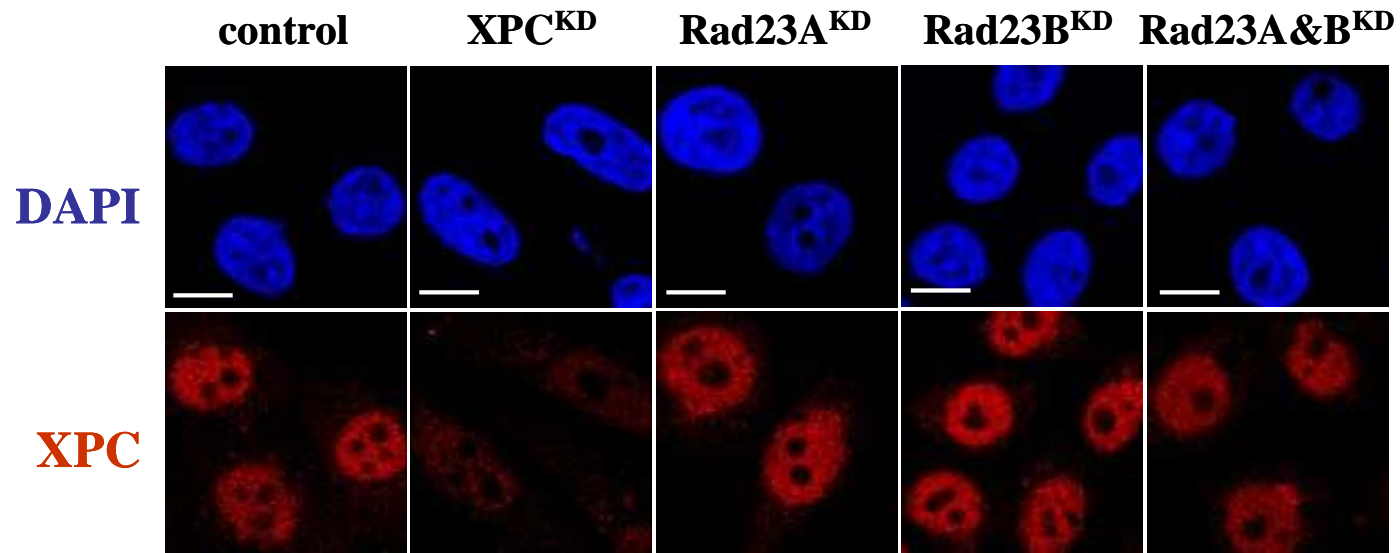


Figure 5 (B). Immunocytochemical detection of XPC protein in silenced HeLa cells

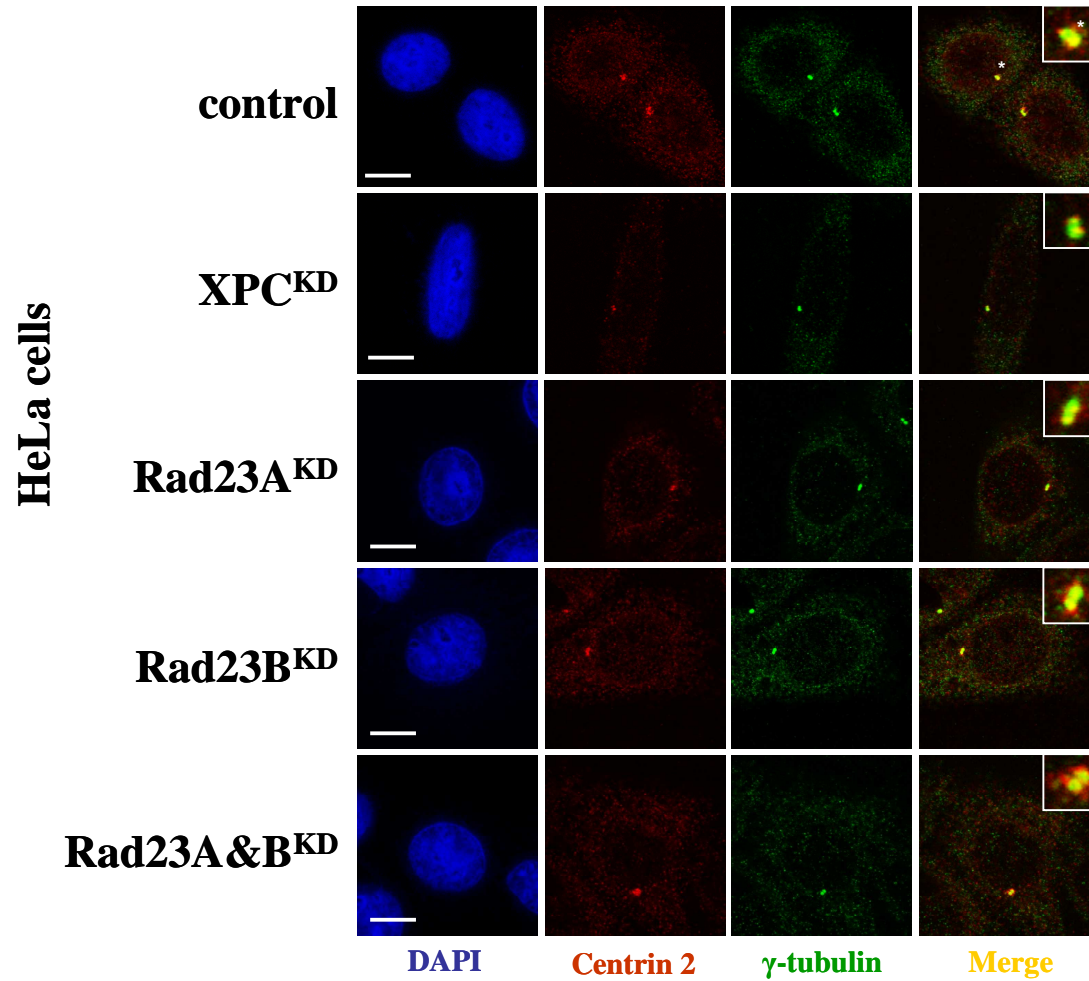


Figure 5 (B). Immunocytochemical detection of centrin 2 and γ -tubulin proteins in silenced HeLa cells

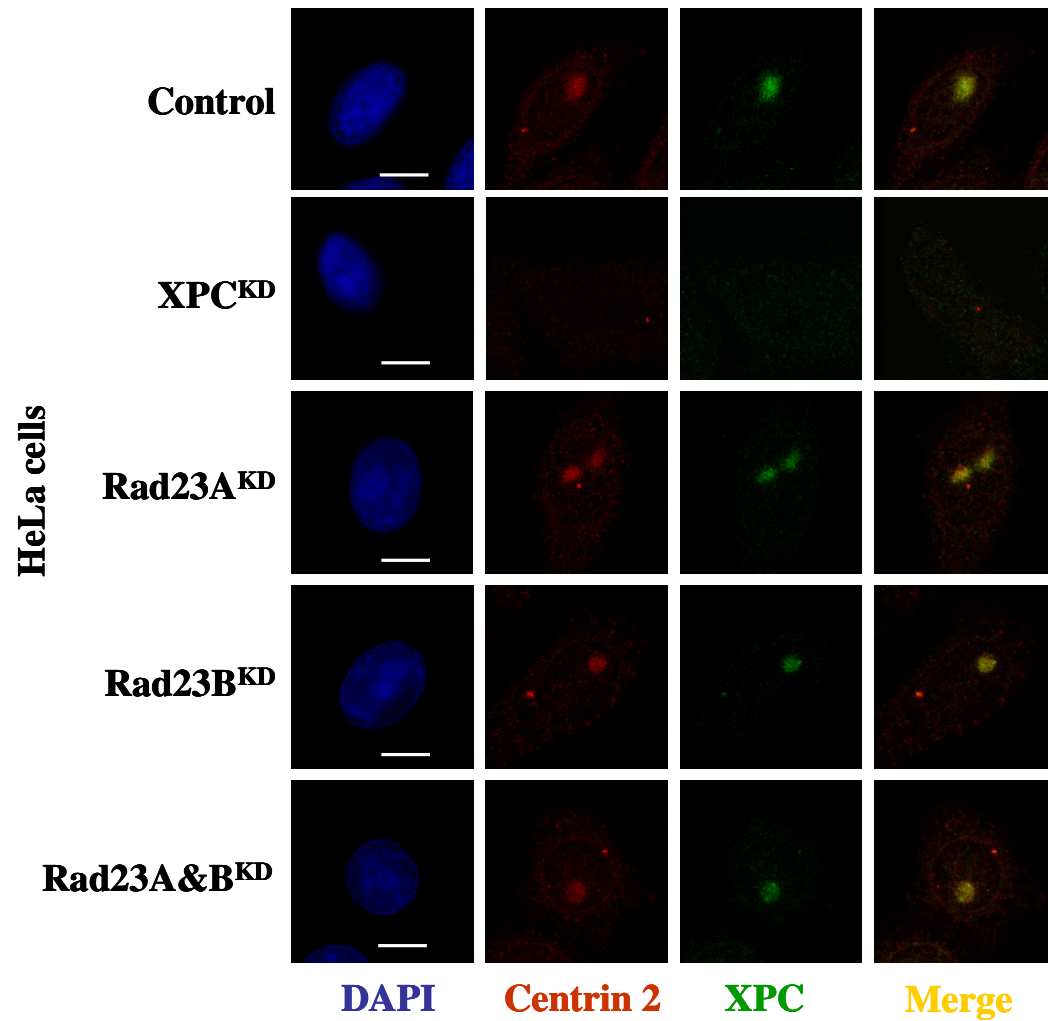


Figure 6 (A). Centrin 2 and XPC nuclear distribution after local UVC-irradiation at 100 J/m²

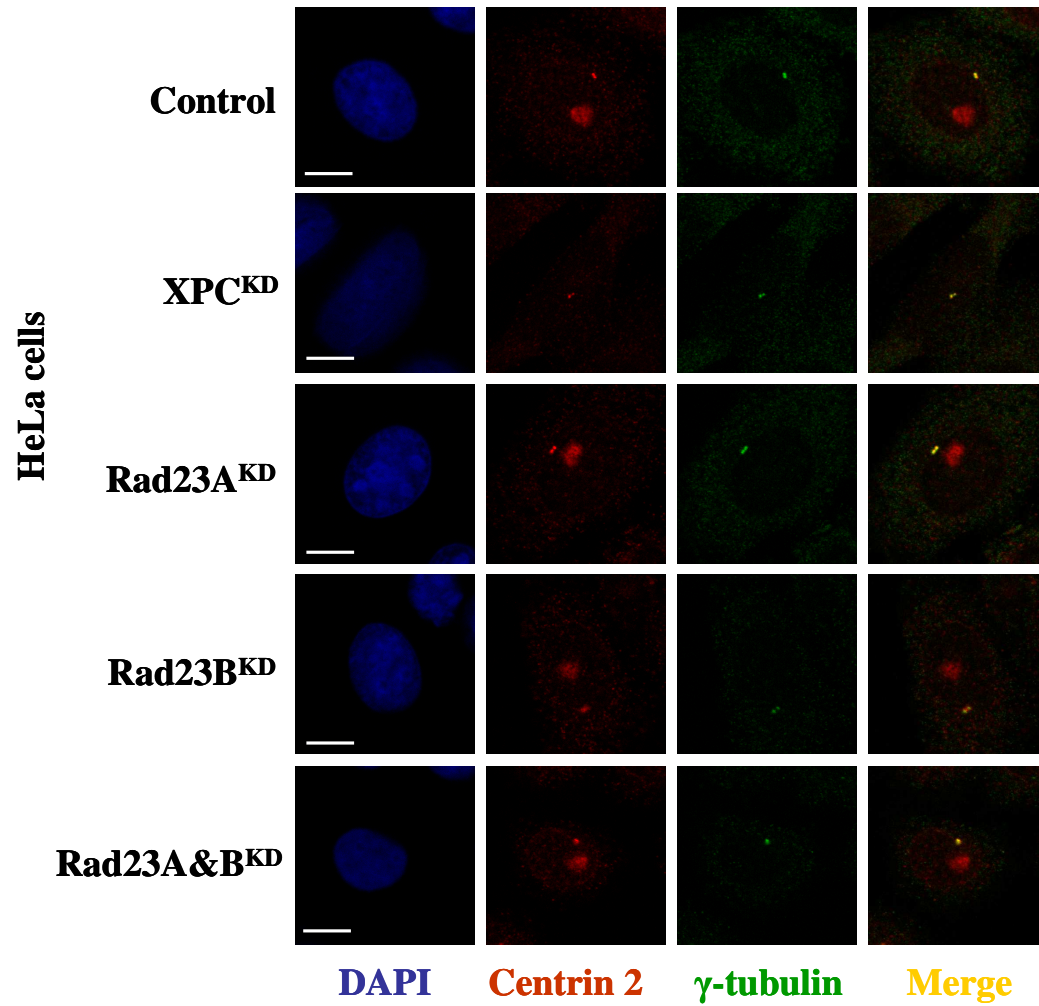


Figure 6 (B). Centrin 2 and γ -tubulin distribution in HeLa cells after local UVC-irradiation at 100 J/m²

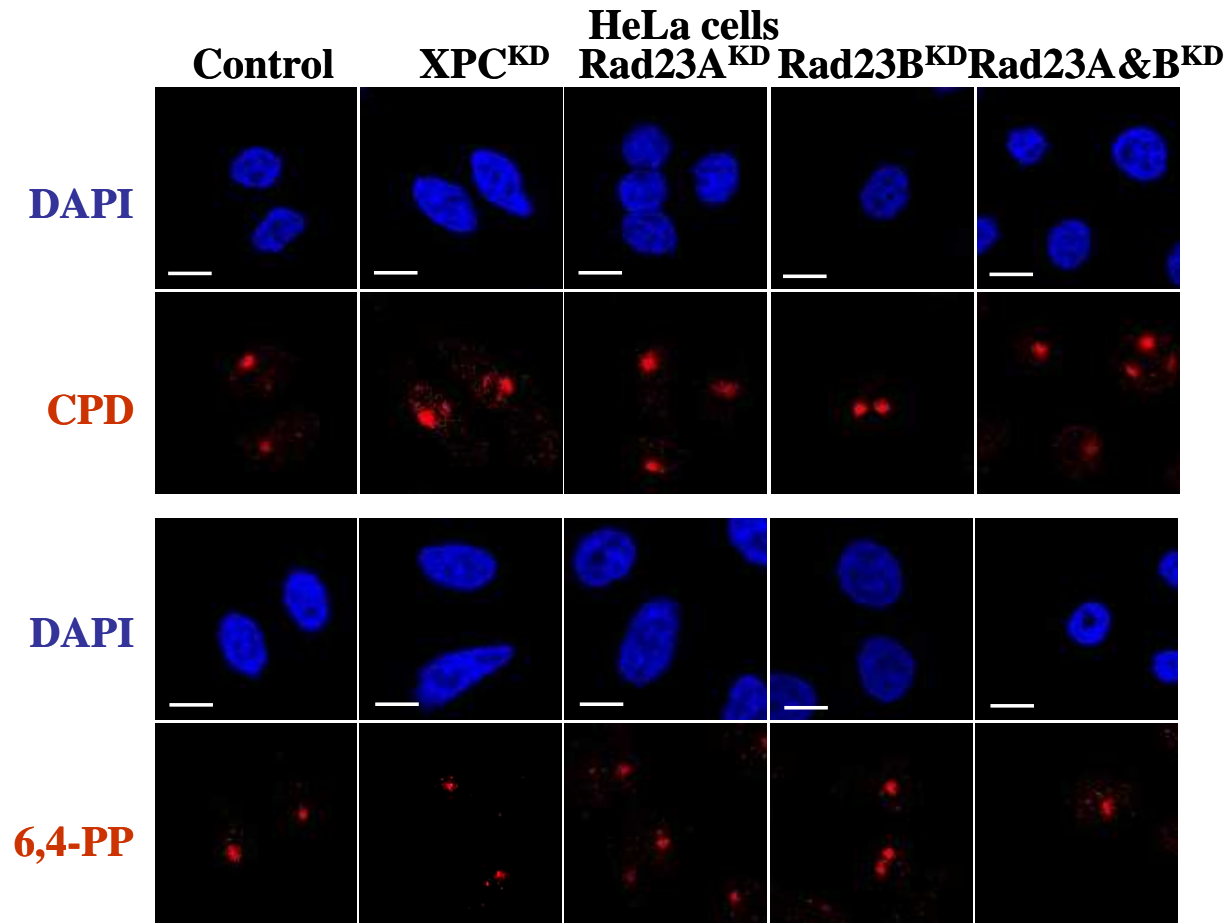


Figure 6 (C): Immunocytochemical detection of cyclobutane pyrimidine dimers (CPD) and Pyrimidine (6,4) Pyrimidones (6,4-PP) in HeLa silenced cells after local UVC irradiation at 100 J/m²

Résultats additionnels de l'article 2

La reconnaissance des lésions par XPC est fonctionnelle dans les cellules Rad23^{KD}

Les protéines XPC et centrine 2 sont localisées aux sites des lésions intranucléaires induites par les UVC. Nous avons vérifié que la protéine étiquetée XPC-EGFP était recrutée efficacement sur des photodommages provoqués par l'impact du laser à 405 nm dans les cellules HeLa Rad23^{KD}. L'accumulation de XPC suit la même cinétique que dans les cellules AS1. Toutefois l'intensité de fluorescence maximale relative observée dans les cellules HeLa est d'environ 1,7 alors qu'elle était d'environ 2 dans les cellules AS1 (Figure 24). Ceci est certainement dû à la présence de la protéine endogène fonctionnelle XPC dans les cellules HeLa, qui a légèrement réduit l'accumulation de la protéine étiquetée. Ce résultat confirme que la micro-irradiation laser est une technique sensible.

XPC est recrutée efficacement dans les cellules présentant une réduction de Rad23A, Rad23B et des deux protéines Rad23A&B. La reconnaissance des lésions formées à 405 nm est fonctionnelle. Le complexe XPC/centrine 2 est donc recruté indépendamment de la présence de Rad23A et Rad23B dans ces cellules.

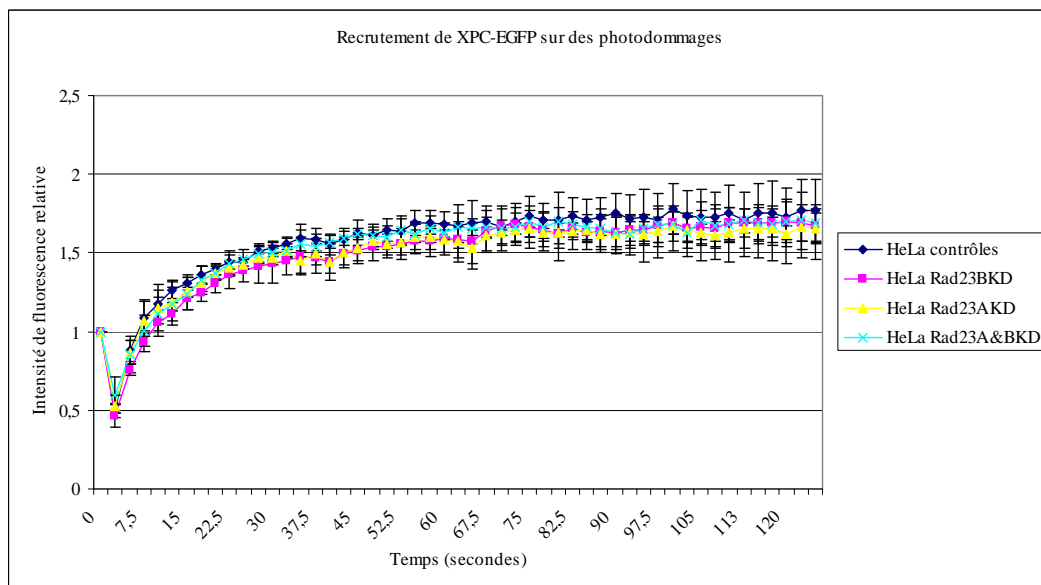


Figure 24. Cinétique de recrutement de XPC-EGFP sur des photodommages. Les cellules ont été transfectées avec un plasmide pXPC-EGFP puis micro-irradiées à 405 nm comme précédemment. Une image a été enregistrée toutes les 2,5 secondes, et les intensités de fluorescence ont été déterminées par ImageJ.

XPC et la centrine 2 sont recrutées sur les lésions en amont de XPA

Des cellules HeLa XPA^{KD} ont été utilisées pour déterminer si XPC et la centrine 2 pouvaient être localisés aux dommages de l'ADN quand l'expression de XPA était réduite. Ces cellules présentent une forte diminution de la quantité de XPA, sont sensibles aux UVC et ont un taux de réparation réduit (Biard et al, 2005). Le recrutement de la centrine 2 et de XPC a été observé dans les cellules HeLa XPA^{KD}, ce qui confirme que le complexe XPC/centrine 2 intervient dans le GG-NER avant XPA (Figure 25). Ceci montre également que le défaut de localisation de la centrine 2 est spécifique de la réduction de XPC et non à un défaut global du NER.

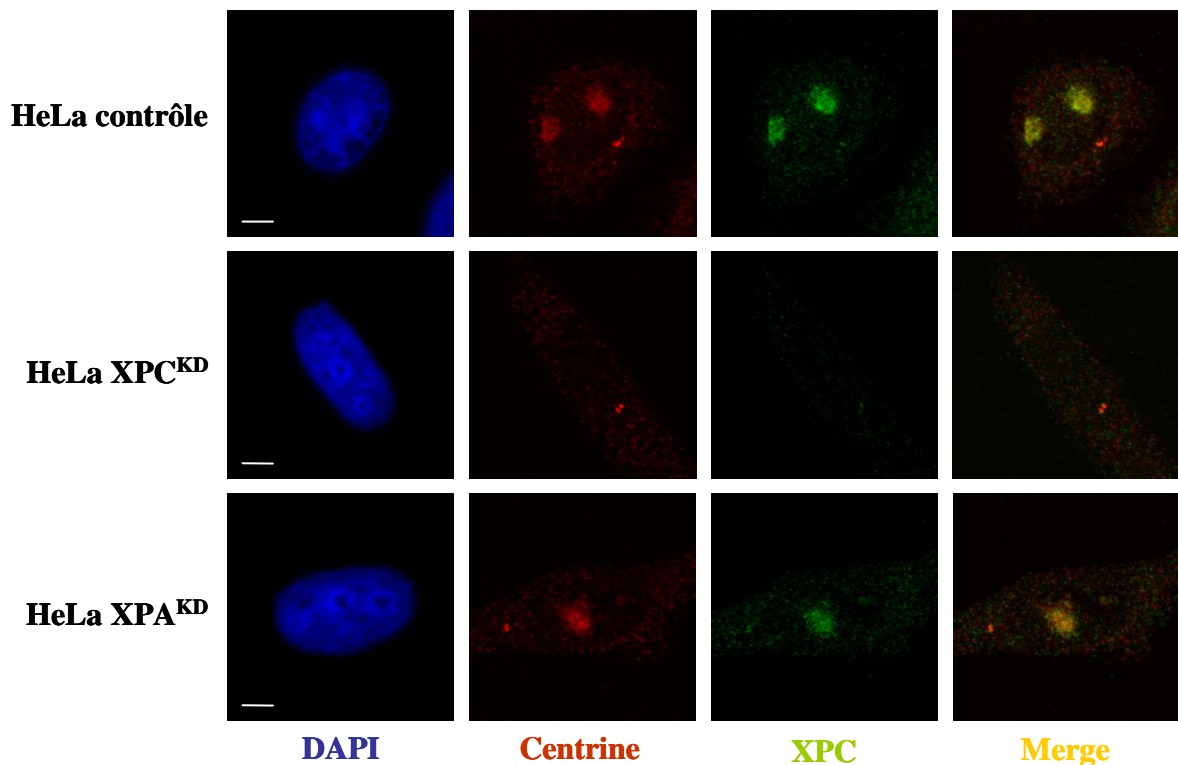


Figure 25. La localisation du complexe XPC/centrine 2 est déficiente uniquement dans les cellules XPC^{KD}. Les cellules ont été irradiées localement aux UVC comme précédemment (figure 22). Un double marquage centrine (souris ;1/1000)/XPC (lapin ;1/100) a été réalisé. L'ADN est révélé au DAPI. Objectif X63, Zoom X6. Barre : 5 µm.

La centrine 2 s'accumule dans les noyaux de cellules XPA^{KD} irradiées aux UVC

Des protéines de réparation de l'ADN comme XPA ou DDB1 sont transférées du cytoplasme vers le noyau après une irradiation aux UVC (Liu et al, 2000; Rademakers et al, 2003). Nous avons vérifié si une irradiation globale aux UVC à 8 J/m² pouvait entraîner une partie de la centrine 2 du cytoplasme vers le noyau, dans des cellules normales ou déficientes pour le GG-NER (XPC^{KD}) ou le NER (XPA^{KD}). Nous n'avons pas détecté de mouvement majeur de la centrine 2 dans les 10 minutes, 6 heures et 24 heures après une irradiation aux UVC dans les cellules HeLa contrôle (Figure 26-A). Cette exposition n'a pas non plus induit d'augmentation de la centrine 2 dans le noyau des cellules XPC^{KD}. Il n'y aurait donc pas de relocalisation d'une partie de la centrine 2 cytoplasmique en réponse à une irradiation aux UVC. Toutefois dans les cellules XPA^{KD}, la centrine 2 s'accumule dans le noyau, 6 heures puis plus fortement 24 heures après une irradiation aux UVC (Figure 26-B). Des cellules déficientes en NER irradiées aux UVC entraînent donc l'accumulation de la centrine 2 dans le noyau des cellules, certainement à cause de la présence de dommages non réparés.

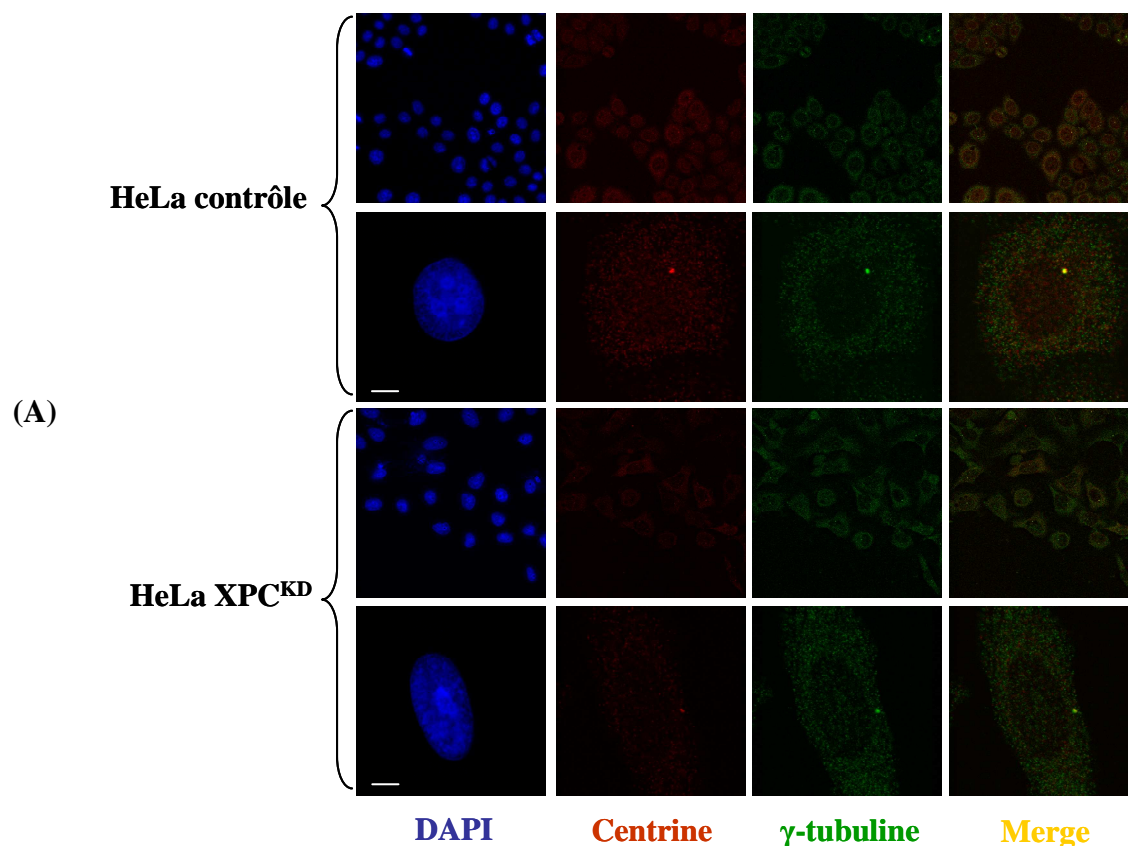


Figure 26 (continue page 152)

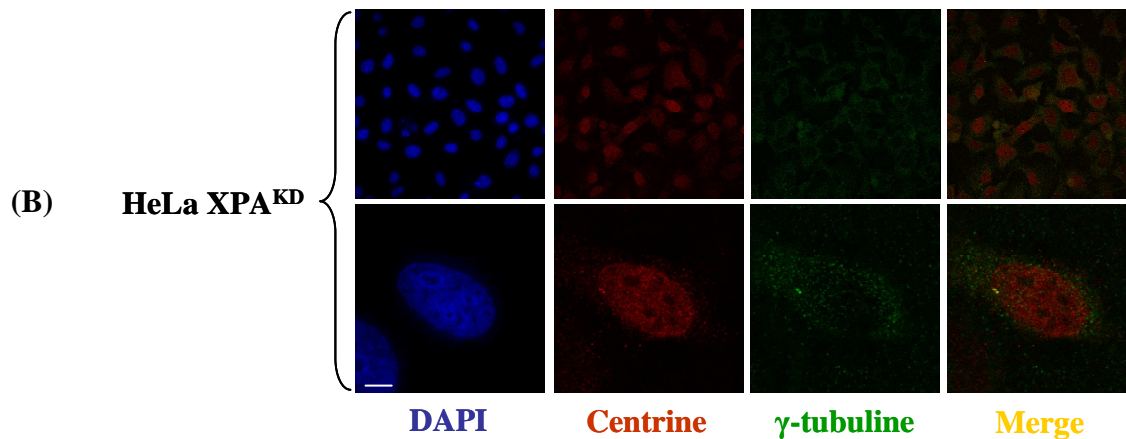


Figure 26. La centrine 2 s'accumule dans les noyaux de cellules déficientes en NER (XPA^{KD}) irradiées aux UVC. Les différentes cellules ont été irradiées aux UVC à 8 J/m². Elles ont été fixées 10 minutes, 6 heures et 24 heures après l'irradiation. Des cellules fixées 24 heures après l'exposition sont représentées. Un co-marquage centrine (souris ; 1/1000)/ γ -tubuline (lapin ; 1/1000) a été réalisé. L'ADN est révélé par le DAPI. Barre : 5 μ m.

La réduction de la protéine XPC modifie la distribution subcellulaire d'AKAP450

La réduction de la centrine 2 dans le centrosome des cellules HeLa XPC^{KD} nous a amené à contrôler l'intégrité du centrosome. Nous avons ainsi réalisé différents marquages de protéines centrosomales dans les cellules contrôle et XPC^{KD} : centrine 3, AKAP450, ninéine et Cnap-1 (Figure 27). La distribution de la centrine 3 est équivalente dans les deux cellules. L'effet de la réduction de la centrine suite à la diminution de la quantité de XPC est donc bien spécifique à la centrine 2. La ninéine est un composant des appendices subdistaux des centrioles pères, impliqué dans la nucléation des microtubules et l'ancrage du centrosome (Delgehy et al, 2005). Cnap-1 est une protéine à domaine « coil-coil » localisée à l'extrémité proximale des centrioles (Fry et al, 1998). C'est une protéine structurale qui est la cible d'une protéine kinase régulatrice du cycle cellulaire Nek2. Ces deux protéines centrosomales ont une distribution normale dans les deux cellules.

Toutefois, nous avons observé que la protéine AKAP450 montrait une distribution désordonnée dans les cellules XPC^{KD} en comparaison aux cellules contrôle (Figure 27). AKAP450 est également une protéine structurale à domaine « coil-coil », qui a une taille de 453 kDa (Keryer et al, 1993). Son nom lui a été attribué car elle sert d'ancrage à la protéine kinase A (« A-Kinase Anchor Protein »). Elle est située au niveau du centrosome tout au long du cycle cellulaire et dans l'appareil de Golgi à l'interphase. Dans les cellules HeLa contrôle,

la protéine AKAP450 est localisée dans le centrosome et regroupée au niveau de l'appareil de Golgi. Dans les cellules XPC^{KD}, le marquage du centrosome est bien visible, mais la distribution dans le reste du cytoplasme est désordonnée. La réduction de XPC a donc perturbé la distribution subcellulaire d'une autre protéine que la centrine 2. Ces résultats suggèrent que XPC pourrait être impliquée dans un système de contrôle d'un ensemble de protéines de régulation du cycle cellulaire.

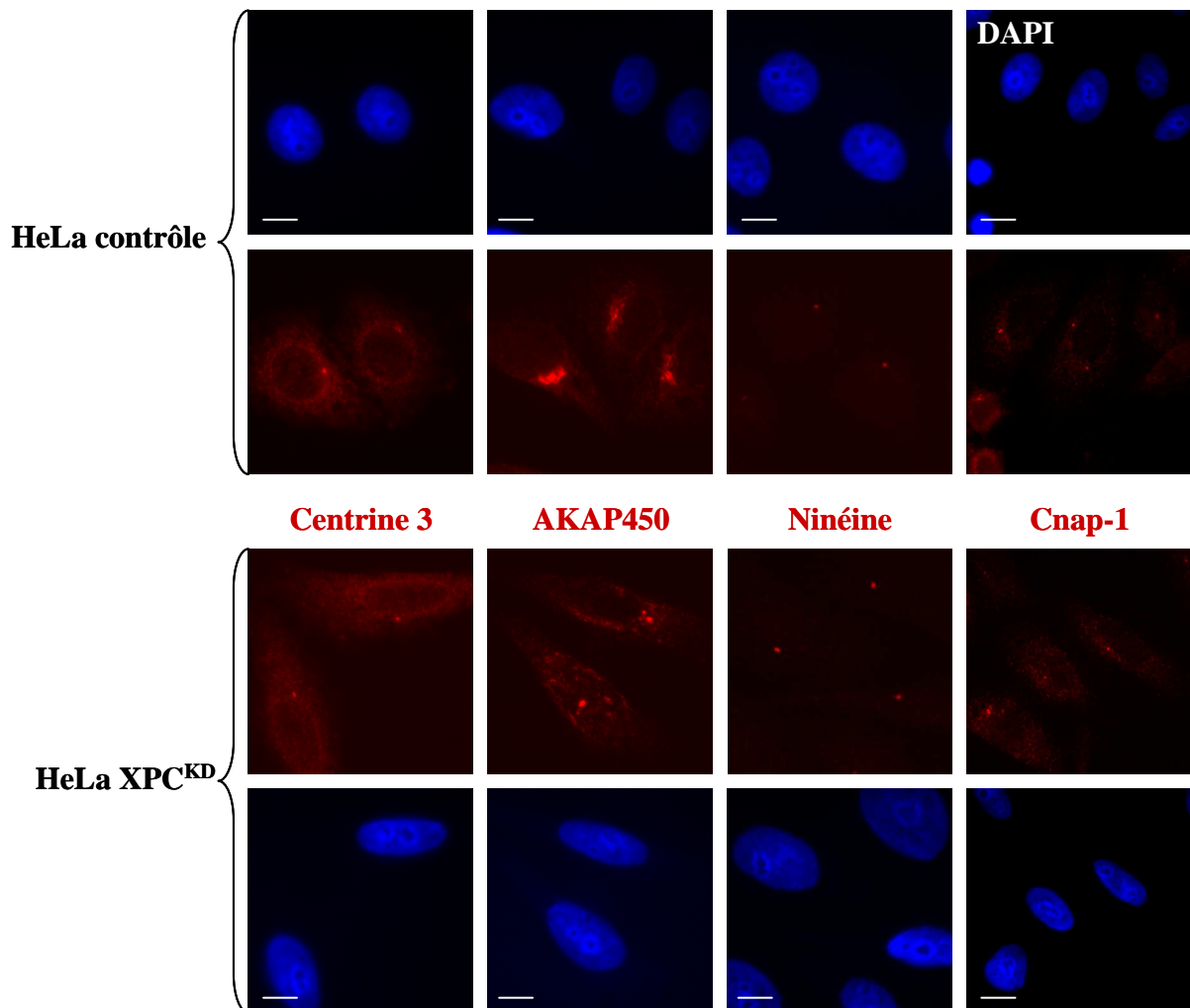


Figure 27. Distribution subcellulaire de protéines centrosomales dans les cellules HeLa contrôle et XPC^{KD}. Les cellules ont été fixées 3 minutes à -20°C dans du méthanol froid. Elles ont ensuite été marquées avec un anticorps anti-centrine 3 (lapin, 1/500), anti-AKAP450 (a24, lapin ; 1/2000), anti-ninéine (lapin ; 1/100) et anti-Cnap-1 (souris ; 1/100). L'ADN est révélé par du DAPI. Ces marquages ont été réalisés en collaboration avec le laboratoire de Michel Bornens à l'Institut Curie Paris. Barre : 10 µm.

Partie 3 : L'équilibre centrosome/noyau de la centrine 2 et l'accumulation du transcrit après une irradiation aux UVC dépendent de la présence de XPC

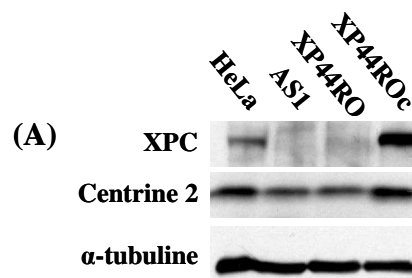
Nous avons précédemment déterminé que l'expression de la centrine 2 était diminuée de 60% quand la quantité de XPC était réduite de 80% dans des cellules HeLa. Les deux conséquences principales observées sont l'absence de la centrine 2 dans le noyau des cellules et aux sites des dommages, et une légère diminution de la centrine 2 centrosomale. La présence et la quantité de XPC semblent être primordiales pour l'équilibre de la centrine 2 entre le noyau et le centrosome. Nous avons voulu vérifier ces résultats dans des cellules de patients XP-C où la protéine XPC mutée est défectueuse pour la réparation de l'ADN. Nous avons utilisé les cellules XP44RO et ces cellules dans lesquelles le gène XPC a été introduit (XP44ROc). Ce modèle cellulaire a permis de montrer que la reconnaissance des lésions par XPC entraînait l'augmentation du transcrit kin17 après une irradiation aux UVC (Masson et al, 2003). Ce résultat suggère que XPC est engagée dans une voie de signalisation entraînant l'augmentation de transcrits après irradiation. La centrine 2 semble être impliquée dans la réponse aux UV en formant un complexe avec XPC aux sites des lésions de l'ADN, et son niveau basal serait dépendant de la présence de XPC. Nous avons voulu savoir si l'ARNm de la centrine 2 pouvait s'accumuler après une irradiation aux UVC, et si la protéine XPC était impliquée dans cette induction. En parallèle, nous avons également analysé les taux des transcrits de Rad23A et Rad23B.

Le niveau basal de la protéine centrine 2 augmente dans les cellules complémentées par XPC

La lignée cellulaire XP44RO est la première lignée établie à partir d'une tumeur d'un patient XP (Keijzer et al, 1989). Elle est dérivée d'une tumeur testiculaire mutée pour XPC. Un rétrovirus portant l'ADNc du gène XP-C a été introduit dans ces cellules qui ont ensuite été sélectionnées. Des expériences de synthèse non programmée d'ADN (« Unscheduled

DNA Synthesis », UDS) et de survie cellulaire ont permis de vérifier la fonctionnalité de la complémentation des cellules XP44RO (Masson et al, 2003).

Nous avons tout d'abord analysé le niveau basal de la protéine centrine 2 par Western blot (figure 28-A). La quantité de centrine 2 est diminuée d'au moins 50% dans deux lignées XP-C en comparaison aux cellules HeLa et à la lignée complétementée XP44ROc. L'introduction de l'ADNc de XPC dans des cellules déficientes a donc permis d'augmenter le niveau basal de la protéine centrine 2 d'au moins un facteur 2. Afin de vérifier si la quantité de protéine pouvait être corrélée au niveau d'expression de l'ARNm, nous avons comparé le taux de transcrits de la centrine 2, ainsi que de Rad23A et Rad23B (figure 28-B). La méthode de PCR quantitative choisie permet de déterminer une quantité relative de transcrits entre une lignée « contrôle » et une lignée « test », par rapport à un ARNm de référence, ici la β -actine. Nous avons donc quantifié l'ARNm des différentes cibles uniquement dans les lignées XP44RO/XP44ROc. Après complémentation des cellules XP44RO, nous observons une quantité similaire des transcrits testés en comparaison à la quantité relative établie à 1 dans la lignée déficiente pour XPC. Ces résultats suggèrent que XPC participe uniquement au maintien du niveau basal de la protéine centrine 2 dans ces cellules, probablement en protégeant la protéine de la dégradation protéasomale.



	Centrine 2	Rad23A	Rad23B	Kin17
(B) XP44RO	1,000	1,000	1,000	1,000
XP44ROc	0,998 +/- 0,116	1,160 +/- 0,033	0,857 +/- 0,163	1,130 +/- 0,040

Figure 28. Le taux de la protéine centrine 2 est réduit en absence de XPC (A) Analyse du niveau basal de la centrine 2 par Western Blot dans des cellules HeLa, des cellules de patients XP-C (AS1 et XP44RO) et complétementées XP44ROc. Le contrôle est l' α -tubuline. **(B)** Comparaison de la quantité d'ARNm de centrine 2, Rad23A et B entre les cellules XP44RO et complétementées XP44ROc. La quantité relative d'ARN dans les cellules complétementées est calculée par rapport au gène de référence β -actine, en comparaison aux cellules XP44RO.

La distribution subcellulaire de la centrine 2 est perturbée dans les cellules XP44RO

Après avoir montré que la quantité globale de la protéine centrine 2 était réduite dans des cellules XP-C, nous avons étudié sa distribution subcellulaire par fractionnement et imagerie cellulaires. La qualité du fractionnement a été contrôlée dans les cellules complémentées (figure 29) : XPC est présente seulement dans les fractions nucléaires 0,3 et 0,5, et l' α -tubuline dans la fraction cytoplasmique S2. Nous observons que dans les deux lignées XP-C, les quantités de centrine 2 détectées dans les extraits totaux et les fractions S2 sont équivalentes et les fractions nucléaires sont quasiment indétectables. La grande majorité de la centrine 2 est donc localisée dans le cytoplasme dans les cellules XP-C.

La quantité totale de centrine 2 augmente après introduction de l'ADNc de XPC dans les cellules XP44RO. La protéine est alors largement présente dans les fractions nucléaires 0,3 et 0,5. Dans tous les cas, la distribution de la γ -tubuline reste inchangée. La complémentation des cellules déficientes en XPC conduit à la translocation d'une majorité de la centrine 2 vers le noyau des cellules complémentées. En effet, l'augmentation de la fraction nucléaire a eu lieu au détriment de la centrine 2 cytoplasmique (fraction S2), sans doute en partie centrosomale. Ceci indique que la présence de XPC peut augmenter la quantité totale de la protéine centrine 2 et la rediriger vers le noyau.

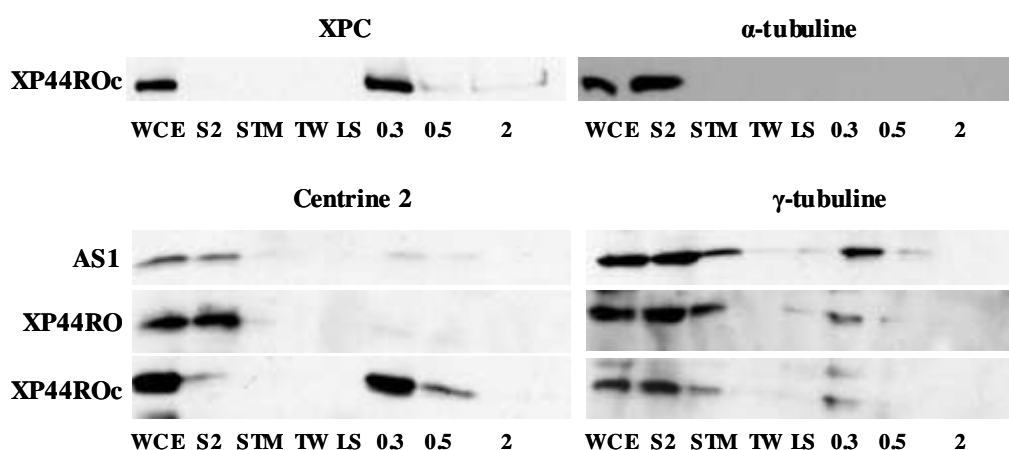


Figure 29. La concentration de la centrine 2 nucléaire est réduite en absence de XPC. Analyse de la distribution de la centrine 2 après fractionnement cellulaire et Western blot. Deux types de fibroblastes déficients pour XPC (AS1 et XP44RO) et un type complémenté XP44ROc sont représentés. Le contrôle du fractionnement est effectué par les marquages de XPC, l' α et la γ -tubuline.

La faible quantité de la protéine centrine 2 dans les cellules de patients XP-C nous a amené à analyser plus précisément la distribution subcellulaire de la centrine 2 au niveau du centrosome. Le co-marquage centrine2/ γ -tubuline nous a ainsi permis d'analyser ces deux protéines centrosomales dans trois lignées déficientes en XPC dont deux lignées transformées AS1 et XP44RO, et une lignée primaire AS433 (Figure 30). On peut distinguer les deux centrioles du centrosome où il y a co-localisation entre la centrine 2 et la γ -tubuline. Dans les trois types cellulaires, nous avons observé des agrégats de centrine 2 regroupés autour du centrosome.

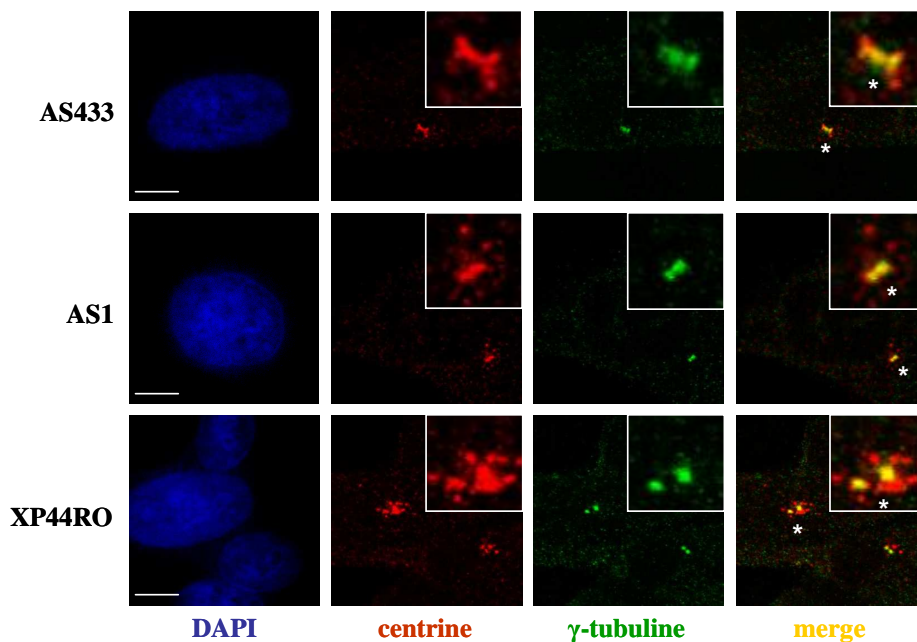


Figure 30. La centrine 2 forme des agrégats autour du centrosome dans trois types de fibroblastes XP-C. Les cellules ont été fixées au méthanol puis marquées avec un anticorps anti-centrine (souris ; 1/1000) et anti γ -tubuline (lapin ; 1/1000). La superposition des deux marquages est représentée à droite. Un agrandissement X4 est représenté en haut à droite et l'ADN est marqué par le DAPI. Barre : 10 μ m.

La réduction de la quantité globale et nucléaire de la centrine 2 en absence de XPC ont donc perturbé sa distribution autour du centrosome. La présence d'agrégats de centrine 2 autour des centrioles suggère une relocalisation ou un mauvais adressage de la centrine 2 en absence de XPC. La centrine 2 se retrouve alors en excès autour du centrosome.

La complémentation des cellules XP44RO a entraîné une augmentation de la centrine 2 dans le noyau et une nette réduction de la quantité de la centrine 2 dans le cytoplasme. Les cellules XP44ROc présentent une expression de XPC hétérogène. L'analyse par microscopie

confocale nous a permis de localiser la centrine 2 dans des cellules exprimant peu ou un excès de XPC (Figure 31). La corrélation entre la quantité de XPC et de centrine 2 a tout d'abord été contrôlée par un co-marquage centrine (souris)/XPC (lapin) (non présenté).

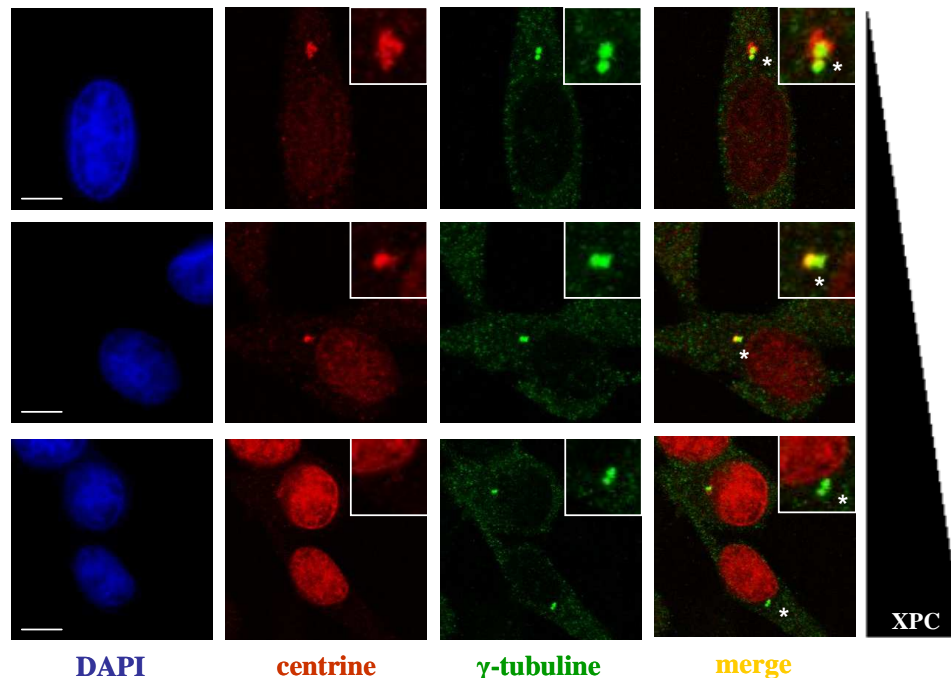


Figure 31. La centrine 2 centrosomale décroît quand la quantité de XPC augmente. Marquage de la centrine et de la γ -tubuline dans des cellules XP-C complémentées par XPC. Les trois champs représentent des concentrations croissantes de XPC. La superposition des deux marquages est représentée à droite. Un agrandissement X4 est représenté en haut à droite de chaque image. L'ADN est marqué par le DAPI. Barre : 10 μ m.

Plus la quantité de XPC augmente, plus la centrine 2 se concentre dans le noyau, au détriment de sa localisation dans le centrosome. Dans les panneaux du haut, la faible quantité de centrine 2 au noyau permet de la détecter très clairement au niveau du centrosome, auréolée de quelques agrégats. Dans les panneaux du milieu la centrine 2 co-localise toujours avec la γ -tubuline au centrosome mais n'est plus entourée de foyers alors que dans ceux du bas, la centrine 2 centrosomale n'est quasiment plus détectable. La majorité des cellules de cette lignée ont une expression légèrement supérieure à des cellules normales, mais la centrine 2 est toujours présente dans le centrosome. Cette analyse par imagerie indique que la quantité et la localisation subcellulaire de la centrine 2 sont directement corrélées à la présence et à la quantité de XPC. Lorsque la quantité de XPC augmente, la centrine 2 s'accumule dans le noyau alors que la centrine 2 centrosomale est dramatiquement réduite.

Durant la mitose, la centrine 2 est normalement détectée principalement au niveau des centrosomes aux pôles des fuseaux mitotiques comme c'est le cas dans les cellules HeLa (Figure 32 et Paoletti et al, 2003). Dans les cellules XP44ROc présentant la quantité de XPC la plus importante, la centrine 2 est visualisée au niveau des chromosomes pendant la mitose. La centrine 2 qui s'est fortement accumulée dans le noyau reste ancrée à la chromatine, ce qui pourrait affecter la division cellulaire.

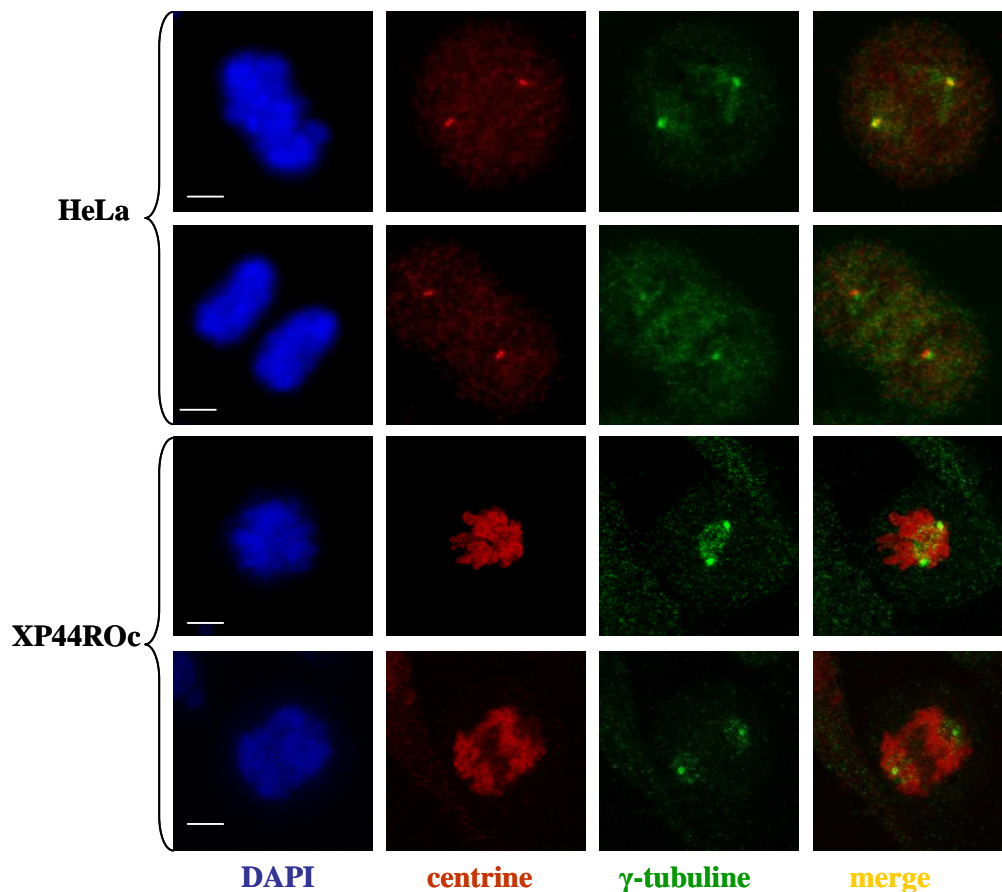


Figure 32. Localisation de la centrine 2 et de la γ -tubuline dans des cellules en mitose. Les cellules HeLa sont en métaphase et télophase. Les cellules XP44ROc sont en prophase et anaphase. Les cellules ont été fixées dans du méthanol à -20°C puis co-marquées avec un anticorps anti-centrine (20H5 ; souris, 1/1000) et anti- γ -tubuline (lapin, 1/2000). L'ADN est révélé par le DAPI. Barre : 5 μm .

En conclusion, l'introduction de l'ADNc de XPC dans les cellules XP44RO a entraîné l'augmentation du niveau basal de la protéine centrine 2, qui se concentre alors dans le noyau. Toutefois, une présence trop importante de XPC peut bouleverser l'équilibre de la centrine 2 en faveur du noyau.

La complémentation des cellules XP-C restaure la localisation du complexe XPC/centrine 2 sur les zones nucléaires endommagées

Nous avons testé si la complémentation des cellules déficientes en XPC permettait la localisation des deux partenaires aux sites des lésions induites par les UVC. La colocalisation de la centrine 2 (anticorps de lapin présentant un fort bruit de fond) avec les CPD n'est visible que dans les cellules complémentées par XPC (Figure 33). XPC et la centrine 2 sont également visualisées au niveau des sites des lésions. La γ -tubuline ne colocalise pas avec la centrine 2.

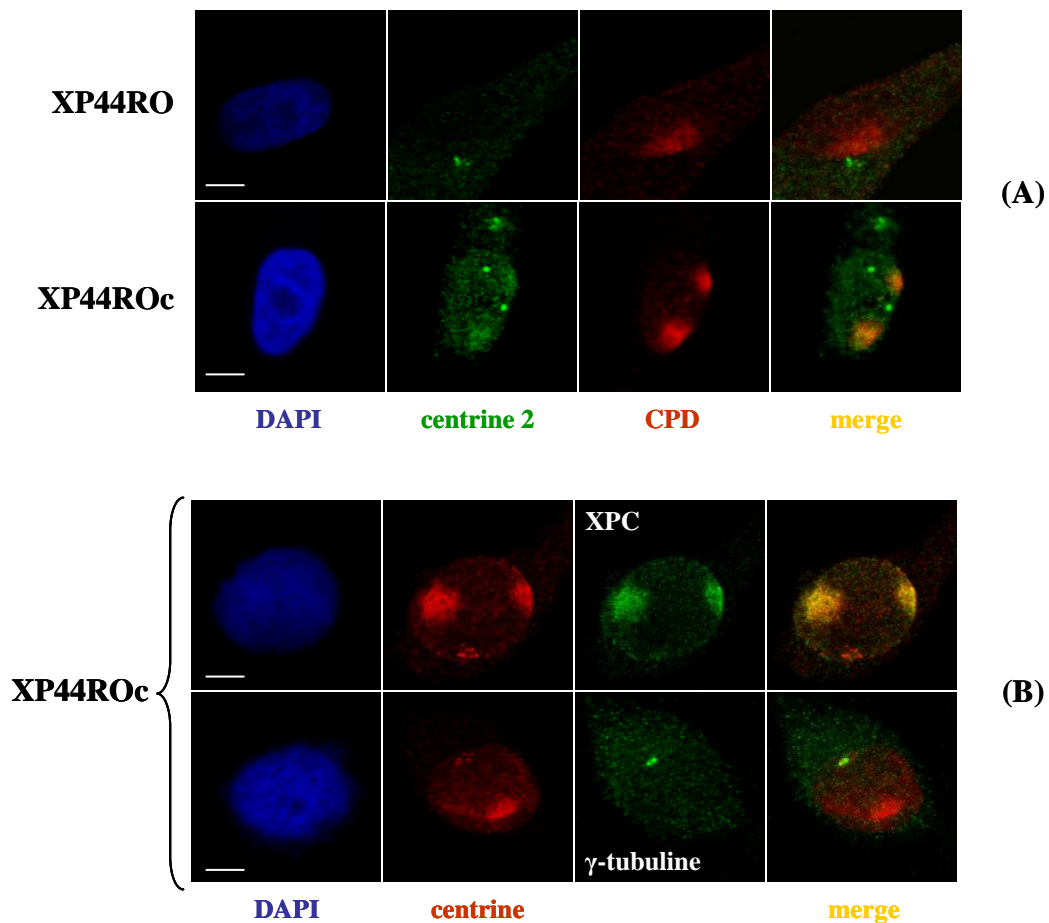


Figure 33 La centrine 2 est localisée aux dommages de l'ADN après complémentation de fibroblastes XP-C. Après irradiation localisée aux UVC (254 nm, 100 J/m²; filtres 0,5 μ m), les cellules XP44RO et XP44ROc ont été incubées 10 minutes à 37°C, fixées puis marquées. 3 co-marquages ont été réalisés : (A) ; CPD (souris; 1/80)/centrine 2 (lapin; 1/1000); (B) ; centrine (souris; 1/1000)/XPC (lapin; /100) ou centrine (20H5 ; souris ; 1/1000)/ γ -tubuline (lapin; 1/1000). La superposition rouge/vert est représentée à droite, et l'ADN est marqué par le DAPI. Barre : 5 μ m.

L'introduction de l'ADNc du gène XPC dans les cellules déficientes en XPC a donc induit la formation du complexe XPC/centrine 2 dans le noyau des cellules et leur focalisation spécifique au niveau des sites des lésions, ce qui permettra de déclencher le GG-NER.

La présence de XPC entraîne l'accumulation des transcrits de kin17, Rad23B et centrine 2 après une irradiation aux UVC

La protéine XPC est impliquée dans une voie de signalisation menant à l'accumulation du transcrit kin17 après une irradiation aux UVC (Masson et al, 2003). Il a également été montré que la présence de XPC entraînait l'augmentation du transcrit Gadd45 (Chang et al, 2003). Ces deux inductions sont maximales 16 heures après l'irradiation. Nous avons déterminé si les quantités des transcrits Rad23A, Rad23B et centrine 2 augmentaient après une irradiation aux UVC, et si la protéine XPC pouvait jouer un rôle dans cette accumulation. La concentration de l'ARNm de KIN17 nous sert de témoin positif.

Les cellules ont été irradiées à des doses entraînant la même survie cellulaire à 7 (XP44RO) et 15 J/m² (XP44ROc), puis récoltées 16 heures après. Les quantités de transcrits ont été déterminées par PCR quantitative. Pour chaque lignée, la quantité relative d'ARNm a été calculée par rapport à cette même lignée non irradiée et récoltée aux mêmes temps (quantité relative égale à 1 ; Table 4).

	XP44RO 7J/m²	XP44ROc 15J/m²	P
centrine 2	1,252+/-0,08	2,180+/-0,250	0,026*
kin17	1,398+/-0,187	2,183+/-0,199	0,007*
Rad23A	2,346+/-0,160	2,365+/-0,358	0,946
Rad23B	1,390+/-0,038	2,137+/-0,215	0,004*
p21	11,282+/-0,919	10,210+/-0,555	0,374

Table 4. Accumulation de transcrits après une irradiation aux UVC. PCR quantitative de fibroblastes XP-C et complémentés. La quantité relative d'ARNm est calculée avec le gène de référence β -actine et par rapport aux mêmes échantillons (XP44RO ou XP44ROc) non irradiés. La significativité statistique a été déterminée par un test de Student. *P<0.05. Les cellules XP44ROc

présentent une augmentation des taux des messagers kin17, Rad23A, Rad23B, centrine 2 et p21 16 heures après l'irradiation. L'accumulation du transcrit p21 est la plus importante, avec une augmentation d'environ 10 fois par rapport au contrôle non irradié. Les autres transcrits ont augmenté d'un facteur situé entre 2 et 2,4. L'irradiation aux UVC a donc entraîné l'activation transcriptionnelle des gènes kin17, Rad23A, Rad23B, centrine 2 et p21.

Toutefois l'irradiation aux UVC des cellules déficientes XP44RO ne provoque pas d'augmentation significative des ARNm de kin17, Rad23B et centrine 2. Les quantités des transcrits Rad23A et p21 sont équivalentes aux cellules complémentées. Les accumulations après irradiation aux UVC de trois transcrits testés (kin17, centrine 2 et Rad23B) sont donc dépendantes de la présence de la protéine XPC.

Ces résultats confortent l'hypothèse que la protéine XPC serait impliquée dans une voie de signalisation responsable de l'augmentation de transcrits de gènes de réponse aux UVC. Les fonctions de ces gènes sont variables, dans la réplication de l'ADN (Kin17), ou en tant que partenaires de XPC, comme la centrine 2 et Rad23B, qui permettent le déclenchement du GG-NER et probablement le couplage avec d'autres voies du métabolisme cellulaire. En plus de son rôle dans le déclenchement du GG-NER en interagissant par exemple avec TFIIF, la reconnaissance des lésions par XPC semble donc pouvoir induire une voie de signalisation provoquant l'activation de la transcription de différents gènes de réponse aux UVC.

Conclusions

L'absence de XPC entraîne une réduction de la quantité de la protéine centrine 2 dans les cellules XP44RO. De plus, la centrine 2 cytoplasmique se concentre en excès autour du centrosome sous-forme d'agrégats. L'introduction de l'ADNc de XPC dans ces cellules a permis d'augmenter la quantité de centrine 2 dans les noyaux, et la centrine 2 centrosomale retrouve une distribution normale. Mais une trop forte expression de XPC, en surchargeant les noyaux de centrine 2, peut restreindre la localisation de la centrine 2 dans le centrosome. Sans irradiation, la présence de XPC semble donc pouvoir jouer un rôle dans la stabilisation d'un de ses partenaires, la centrine 2, permettant également sa distribution entre le noyau et le centrosome.

L'irradiation des cellules XP44ROc aux UVC a entraîné d'une part la localisation du complexe XPC/centrine 2 sur les sites des lésions et d'autre part l'accumulation de transcrits de différents gènes de réponse aux UV : kin17, Rad23B et la centrine 2. Les accumulations des ARNm de Rad23A et p21 sont indépendantes de la protéine XPC. Nos résultats confirment que la protéine XPC pourrait faire partie d'un système de signalisation menant à l'accumulation d'un certain nombre de transcrits après la reconnaissance des lésions induites par les UVC. Nous avons montré que les deux protéines Rad23A et Rad23B n'auraient pas la même fonction chez l'homme au moins en réponse à une irradiation aux UVC. L'accumulation respective de leurs transcrits serait d'ailleurs induite par deux voies différentes, dont celle impliquée dans l'augmentation de Rad23B est dépendante de la présence de XPC.

Discussion

L'interaction XPC/centrine 2 : rôle dans l'équilibre centrosome/noyau de la centrine 2

Un mode d'interaction très conservé parmi les centriques

La centrine 2 interagit avec XPC par sa partie C-terminale. Le domaine de liaison de XPC est également situé dans sa partie C-terminale, des résidus N847 à R863 (Popescu et al, 2003 ; Yang et al, 2006). Cette région adopte une structure en forme d'hélice α en présence de centrine 2, très conservée chez les cibles des protéines à mains EF. Cette hélice α de XPC est profondément enfouie dans une poche hydrophobe formée par les deux boucles de la moitié C-terminale de la centrine 2. Elle expose trois acides aminés formant une triade hydrophobe constituée des résidus W848, L851 et L855. Les acides aminés C-terminaux du peptide P17-XPC sont impliqués dans des interactions électrostatiques avec la centrine 2 mais ne présentent pas un rôle primordial dans la liaison. Un motif minimal de cinq acides aminés contenant deux résidus de la triade W848 et L851 de XPC est nécessaire pour interagir avec la centrine 2 tronquée de ses 25 résidus N-terminaux et nommée centrine 2 _{Δ N25}. Le résidu W848 est crucial pour l'interaction, la substitution de ce seul acide aminé étant suffisante pour inhiber l'interaction avec la centrine 2 *in vitro* et *in vivo*. Les résidus W848 et L851 ont des positions équivalentes dans une cible de la centrine de *Chlamydomonas*, la protéine Kar1 (Hu et al, 2003). Chez la levure, Sfi1 interagit d'une manière similaire avec Cdc31 (Li et al, 2006). La centrine 2 interagit d'ailleurs avec la protéine humaine hSfi1 (Martinez-Sanz et al, 2006). L'importance de cette diade dans les ligands des centriques de différentes espèces (levure,

algue, humain) montre l'existence d'un mode d'interaction très conservé entre la centrine et ses cibles.

L'interaction entre XPC et la centrine 2 et leurs homologues respectifs est également conservée dans différentes espèces. Cette interaction joue un rôle dans la réponse aux UV. Ainsi, chez la levure *S.cervisiae*, Cdc31 interagit avec rad4/rad23, et des mutants de Cdc31 sont sensibles aux UV (Chen et Madura, 2008). Chez *A.Thaliana*, AtCen2 est liée à AtRad4 (Liang et al, 2006). AtCen2 est localisée dans le noyau après une exposition aux UVC ou au cisplatine et il existe une corrélation directe entre le niveau d'expression d'AtCen2 et l'efficacité du NER *in vitro* (Molinier et al, 2004). La grande conservation de ces protéines, de leur mode d'interaction et de son rôle dans la sensibilité aux UV indique une participation à un processus biologique général nécessaire à tous les eucaryotes.

Le domaine C-terminal de la centrine 2 présente une grande flexibilité. Ce domaine contient deux sites de liaison au Ca^{2+} physiologiquement actifs, les sites III et IV (Matei et al, 2003). Il présente une forte affinité pour le Ca^{2+} en absence de sa cible, et la liaison du peptide P17-XPC à la centrine 2 est possible en absence de Ca^{2+} . Mais la liaison de la centrine 2 au peptide permet de stabiliser sa structure et d'augmenter ainsi son affinité pour le Ca^{2+} . L'inverse est également vrai : plus la centrine 2 lie une quantité importante de Ca^{2+} , plus l'affinité pour le peptide P17-XPC augmente. Les affinités pour le Ca^{2+} et XPC sont donc inter-dépendantes. Les sites III et IV de liaison au Ca^{2+} sont d'ailleurs proches du résidu W848 de XPC. Ces données ouvrent la possibilité de l'existence d'un lien entre l'homéostasie calcique et la réparation de l'ADN. Le domaine N-terminal possède une conformation stable en faisceaux d'hélices α antiparallèles. Dans ce domaine, les chaînes latérales hydrophobes sont enfouies et il ne peut pas lier le Ca^{2+} . Cette structure peu flexible ne peut pas interagir avec XPC. Bien que la centrine 2 ait un mode d'interaction conservé avec les protéines à mains-EF, son interaction diffère par exemple de la CaM car chez cette dernière, qui possède quatre mains EF fonctionnelles, ce sont les deux domaines qui entourent l'hélice α de la cible. Toutefois, comme chez la CaM, la centrine 2 agit comme un senseur de Ca^{2+} : sous une forme chargée par le Ca^{2+} , elle interagit avec des cibles spécifiques pour moduler son activité cellulaire.

Les cristaux s'assemblent sous la forme d'un dimère asymétrique où les deux complexes interagissent par une deuxième triade hydrophobe située dans l'hélice α des peptides P17-XPC. Elle est composée des résidus L850, I857 et L861. Cette interaction peptide-peptide s'est révélée possible par un contact dans le réseau cristallin et n'aurait donc pas de signification physiologique. Mais, dans un contexte cellulaire, cette seconde surface hydrophobe exposée pourrait être impliquée dans d'autres interactions, avec d'autres domaines de XPC ou avec d'autres cibles comme TFIIF.

La substitution d'un seul résidu de XPC inhibe l'interaction in vivo

La centrine 2 est localisée dans toute la cellule dont 10% est concentrée dans le centrosome (Paoletti et al, 1996). Ses fonctions les plus connues sont relatives à sa présence dans les centrioles du centrosome. Elle est phosphorylée au niveau du résidu sérine170 par la protéine kinase A très tôt dans la mitose (Lutz et al, 2001). Cette modification post-traductionnelle pourrait initier la séparation du centrosome et la formation du fuseau mitotique. La centrine 2 est également impliquée dans la duplication des centrioles pendant la phase S du cycle cellulaire (Salisbury et al, 2002). La présence de la centrine 2 au centrosome est donc primordiale pour la division cellulaire. La centrine 2 intervient également dans l'export des ARNm et des protéines (Resendes et al, 2008). Elle est localisée aux pores nucléaires et elle interagit avec un complexe de nucléoporines Nup107-160 qui est essentiel pour l'export des ARNm et l'assemblage correct du fuseau mitotique (Orjalo et al, 2006). La centrine 2 est aussi présente dans le noyau où elle interagit avec XPC et où elle joue un rôle dans l'initiation du GG-NER en stimulant la liaison de XPC/Rad23B à l'ADN endommagé (Araki et al, 2001 ; Nishi et al, 2005). La distribution subcellulaire de la centrine 2 est donc importante pour ses multiples fonctions biologiques dans le centrosome, le noyau et au niveau des pores nucléaires.

Nous avons montré que XPC et la centrine 2 interagissaient dans les cellules humaines. Par contre, la centrine 3 est incapable de se lier à XPC. Seule la modification W848A de XPC abolit l'interaction *in vitro* et *in vivo*. La centrine 2 n'apparaît pas majoritairement nucléaire comme c'est le cas pour XPC, indiquant que seule une fraction de

la centrine 2 pourrait être liée à XPC. Suite à la surexpression de XPC, une partie de la centrine 2 est relocalisée du cytoplasme vers le noyau. Cet effet n'est plus visible quand la protéine XPC(W848A) est exprimée. La substitution d'un seul acide aminé de XPC peut ainsi inhiber l'interaction entre XPC et la centrine 2 et inhiber l'augmentation de la concentration de la centrine 2 nucléaire dans les cellules HeLa. Ceci suggère que XPC pourrait être essentielle pour la localisation nucléaire de la centrine 2.

XPC et la centrine 2 forment un complexe ancré à la chromatine

XPC est majoritairement attachée à la chromatine en conditions basales (Wang et al, 2004b). Nous avons montré que la centrine 2 nucléaire était liée à XPC sous la forme d'un complexe ancré à la chromatine. Sans irradiation la centrine 2 nucléaire serait donc toujours complexée à XPC. Dans des cellules HeLa, seulement 10% de Rad23B est complexée à XPC alors qu'elle est majoritairement localisée dans le noyau (van der Spek et al, 1996). Contrairement à la centrine 2, seule une petite fraction nucléaire de Rad23B est donc liée à XPC. XPC interagit avec Rad23B et la centrine 2 par des domaines différents (Figure 5), indiquant que les trois protéines existent sous la forme d'un complexe.

Quand la quantité de XPC est réduite dans les cellules HeLa XPC^{KD}, la centrine 2 sous forme libre dans le noyau des cellules devient indétectable. La présence de XPC est donc requise pour que la centrine 2 puisse être localisée dans le noyau. La centrine 2 ne présente d'ailleurs pas de NLS dans sa séquence protéique. De plus l'expression du variant XPC(W848A) ne permet pas d'augmenter la fraction nucléaire de la centrine 2, indiquant qu'une interaction fonctionnelle entre XPC et la centrine 2 détermine la localisation de la centrine 2 dans le noyau des cellules. La fonction nucléaire de la centrine 2 semble donc strictement dépendante de la présence de XPC et sans doute liée à la présence de lésions sur l'ADN.

La présence de XPC détermine le niveau basal de la protéine centrine 2

Comme c'est le cas dans les cellules XPC^{KD}, la centrine 2 est pratiquement absente du noyau de cellules XP44RO et AS1 dérivées de patients XP-C où la protéine XPC est tronquée au niveau des résidus 220 et 572, respectivement. Ces fragments ne sont pas fonctionnels pour le GG-NER ; toute la partie C-terminale la plus importante pour les fonctions biologiques de XPC étant absente. Il est intéressant de noter que ces fragments ne contiennent pas non plus le site d'interaction avec la centrine 2.

Dans ces cellules et dans les cellules XPC^{KD}, la quantité globale de la protéine centrine 2 est réduite, indiquant que la diminution ou l'absence de XPC pourrait affecter le niveau basal de la centrine 2 en diminuant sa stabilité ou son expression. Dans les cellules XPC^{KD} le taux d'ARNm de la centrine 2 est diminué de 60% par rapport aux cellules contrôle. Par contre dans les cellules XP44ROc, le taux de transcrit est similaire aux cellules XP44RO. Ceci suggère que XPC joue un rôle dans la régulation basale transcriptionnelle de la centrine 2 spécifiquement dans les cellules HeLa. En conclusion, le niveau basal protéique de la centrine 2 est donc en partie dépendant de la présence de XPC. Le rôle éventuel de XPC dans la stabilisation de la centrine 2 reste à déterminer mais nos résultats indiquent que XPC pourrait avoir un rôle dans la régulation du niveau basal d'une protéine.

Le niveau basal de XPC est lui aussi finement régulé : cette protéine doit être présente en quantité suffisante afin de permettre le déclenchement rapide et efficace du GG-NER mais une quantité trop importante est toxique pour les cellules. La présence de XPC permet de réguler le niveau basal et de déterminer la localisation de la centrine 2 dans le noyau. Sachant que la centrine 2 est en partie localisée au niveau des pores nucléaires, une fraction de XPC proche de la membrane nucléaire pourrait induire l'importation de la centrine 2. On peut également envisager qu'elle est importée dans le noyau indépendamment de XPC et qu'elle serait dégradée quand elle ne peut pas former de complexes avec XPC. Tous ces résultats suggèrent que la fonction nucléaire de la centrine 2 implique la formation de complexes avec XPC en conditions basales, ce qui permettra une réponse rapide de ce complexe après la formation de dommages à l'ADN.

La présence de XPC détermine la distribution subcellulaire de la centrine 2

L'absence de XPC a également un impact sur la fraction centrosomale de la centrine 2, requise pour la division cellulaire. Dans les cellules XPC^{KD}, nous avons mis en évidence une diminution de la centrine 2 au centrosome alors que dans toutes les cellules de patients XP-C testées, nous avons observé la formation d'agrégats de centrine 2 autour du centrosome. Ces différences peuvent s'expliquer par le fait que la quantité du transcrit centrine 2 est réduite dans les cellules XPC^{KD} alors qu'elle est stable dans les cellules XP44RO et XP44ROc. De plus, dans les cellules XPC^{KD}, il reste 20% de la protéine XPC. Etant donné que la quantité de XPC semble jouer un rôle important dans la distribution subcellulaire de la centrine 2, il est vraisemblable que cette fraction pourrait être responsable des différences observées avec les cellules dérivées de malades XP-C.

Les marquages de trois protéines centrosomales, la ninéine, cnap-1 et la centrine 3, sont normaux dans les cellules HeLa XPC^{KD}. La diminution de la centrine 2 dans le centrosome des cellules HeLa XPC^{KD} semble insuffisante pour affecter l'intégrité du centrosome et la division cellulaire. L'effet de la réduction de la centrine 2 sur la duplication des centrioles observé par Salisbury et al (2002) a été observé après la réduction de l'expression de la centrine 2 de 90%. Une diminution de 60% n'est sans doute pas suffisante pour affecter la division cellulaire. Mais il est tout de même intéressant qu'une réduction de 80% de la quantité de XPC puisse affecter la distribution de la centrine 2 au centrosome. La sélection de clones XPC^{KD} a été difficile, avec une mortalité cellulaire importante (Biard et al, 2005). Nous n'avons pas pu sélectionner de clones présentant une réduction plus importante de XPC. Ceci peut sans doute s'expliquer par le fait que la réduction de la centrine 2 au centrosome serait trop importante pour permettre la division de ces cellules.

Toutefois nous avons observé une distribution anormale de la protéine AKAP450 dans les cellules XPC^{KD}. Les protéines de la famille AKAP sont des protéines d'échafaudage qui ciblent la protéine kinase A à proximité de la voie AMPc/PKA (Felicciello et al, 2001). AKAP450 est localisée au centrosome et au niveau de l'appareil de Golgi à l'interphase, cette structure étant altérée pendant la mitose (Takahashi et al, 1999). Elle ancre des γ -TuRCs au centrosome et fournirait des sites de nucléation des microtubules (Takahashi et al, 2002).

AKAP450 sert d'ancrage à de nombreuses molécules de signalisation et effecteurs du cycle cellulaire (Keryer et al, 1993 ; Witczak et al, 1999 ; Lange et al, 2002). Elle aurait ainsi un rôle dans la duplication des centrioles et la progression du cycle cellulaire en organisant localement un réseau de régulateurs du cycle cellulaire (Keryer et al, 2003). Par exemple, elle localise la cycline E-Cdk2 au centrosome (Nishimura et al, 2005). Notre résultat est basé sur une observation de microscopie, qui suggère que la réduction de XPC peut affecter la distribution subcellulaire d'une autre protéine de la division cellulaire que la centrine 2. De plus des expériences de double-hybride réalisées avec AKAP450 ont permis d'identifier XPC comme interagissant avec cette protéine (Guy Keryer, communication personnelle). Les liens entre XPC et AKAP450 suggèrent qu'il y aurait une régulation coordonnée de signaux intracellulaires permettant de faire un lien entre la réparation de l'ADN et le cycle cellulaire. AKAP450 pourrait ainsi servir de plateforme à de multiples signaux cellulaires suite à une irradiation aux UV, impliquant la régulation de protéine-kinases et de cyclines qui induiraient un arrêt du cycle cellulaire.

Une grande majorité des cellules de patients XP-C présentent des agrégats de centrine 2 regroupés autour du centrosome. Ceci peut s'expliquer par l'absence de XPC qui inhibe la présence de la centrine 2 au noyau entraînant un excès de centrine 2 dans le cytoplasme qui forme alors des foyers autour du centrosome. La distribution de la γ -tubuline est normale dans ces cellules, indiquant que ces foyers ne pourraient contenir que la centrine 2. Mais d'autres marquages de protéines centrosomales sont nécessaires et nous devons analyser plus précisément la dynamique de ces foci afin de déterminer s'il s'agit de centrioles surnuméraires. La formation de centrioles surnuméraires a été observée dans différents cas. En absence de centriole pré-existant, certaines cellules assemblent un nombre variable de centrioles *de novo*. Cet assemblage commence avec la formation d'agrégats de centrine sous-forme de pré-centrioles qui seront matures à la division suivante (La Terra et al, 2005). De plus, l'augmentation du PCM après surexpression de péricentrine peut entraîner la formation de centrioles surnuméraires dans des cellules arrêtées en phase S (Loncarek et al, 2008). La présence de centrioles surnuméraires a été observée dans le cas d'amplification du centrosome dans une lignée de cancer du sein, entraînant la formation de fuseaux mitotiques anormaux et des défauts de mitose (D'Assoro et al, 2004). Mais bien que l'amplification du centrosome puisse induire la formation de fuseaux multipolaires, la présence de centrosome surnuméraire n'entraîne pas nécessairement la naissance de ces fuseaux anormaux (Qunityne et al, 2005).

La formation d'agrégats de centrine 2 est spécifique de l'absence de XPC : la complémentation des cellules XP44RO a entraîné une augmentation de la centrine 2 nucléaire et la disparition des foyers de centrine 2. Plus la concentration de XPC augmente dans ces cellules, plus la centrine 2 se concentre dans le noyau et plus la quantité de la centrine 2 au centrosome diminue jusqu'à n'être plus détectable. La modulation de la quantité de XPC perturbe donc l'équilibre de la centrine 2 en affectant sa stabilité et sa distribution subcellulaire. En outre, quand l'expression de XPC entraîne une trop forte accumulation de la centrine 2 dans le noyau au détriment de la centrine 2 centrosomale, la centrine 2 est alors majoritairement située proche des chromosomes pendant la mitose. La surexpression de XPC est toxique pour les cellules. L'accumulation de trop nombreux complexes XPC/centrine 2 sur les chromosomes pendant la réplication de l'ADN et/ou la mitose pourrait expliquer en partie cet effet néfaste pour les cellules.

Tous ces résultats suggèrent que XPC joue un rôle dans le maintien du niveau basal protéique et de la distribution subcellulaire de la centrine 2 dans les cellules humaines (Figure 34). Ceci est très important compte-tenu du rôle de la centrine 2 dans la division cellulaire. L'interaction de XPC avec la centrine 2 pourrait alors être un lien entre la reconnaissance des lésions, le déclenchement de la réparation et la coordination de la division cellulaire. La centrine 2 est avant tout une protéine senseur de Ca^{2+} . Les changements de concentrations de Ca^{2+} intracellulaire produisent des signaux qui contrôlent une variété de processus cellulaires comme la transcription de gènes, la régulation du cycle cellulaire et de l'apoptose (Roderick et Cook, 2008). Les UV entraînent d'ailleurs une augmentation de la concentration en Ca^{2+} intracellulaire. Les affinités de la centrine 2 pour le Ca^{2+} et XPC sont interdépendantes et suggèrent que la centrine 2 pourrait moduler son interaction avec XPC et la réponse aux UV en fonction des signaux calciques intracellulaires.

La reconnaissance des lésions de l'ADN lors du GG-NER

La centrine 2 fait partie du complexe formé par XPC et Rad23B impliqué dans l'initiation du GG-NER. *In vitro* la centrine 2 peut stabiliser XPC sur la lésion uniquement en

coopération avec Rad23B (Araki et al, 2001). La centrine 2 peut augmenter jusqu'à 20 fois la liaison du complexe XPC/Rad23B sur l'ADN endommagé (Nishi et al, 2005). Elle stimule également légèrement l'affinité du complexe à l'ADN normal. Mais la fonction nucléaire de la centrine 2 est difficile à caractériser car elle n'est pas indispensable à l'activité du GG-NER. Toutefois l'existence d'une interaction forte avec XPC *in vivo* suggère un rôle dans les toutes premières étapes du GG-NER. Ceci est conforté par le fait que cette interaction est très conservée parmi les eucaryotes et qu'elle est impliquée dans la réponse aux UV dans différents organismes. Nous avons donc déterminé si la centrine 2 pouvait être localisée aux sites des dommages induits par les UVC et si l'inhibition de l'interaction entre XPC et la centrine 2 pouvait affecter l'initiation du GG-NER *in vivo*.

Le complexe XPC/centrine 2 s'accumule sur les sites des dommages nucléaires

L'étape précoce de la réponse aux dommages de l'ADN est le ciblage rapide et l'accumulation de protéines de réparation donnant naissance à des foyers de réparation. La technique généralement utilisée pour analyser le recrutement des protéines sur les lésions induites par les UVC est l'irradiation localisée avec des filtres de polycarbonate (Katsumi et al, 2001). La centrine 2, comme XPC, se localise aux dommages de l'ADN très rapidement après une irradiation aux UVC. L'existence d'un complexe basal XPC/centrine 2 ancré à la chromatine a ainsi permis sa localisation rapide sur les sites des lésions de l'ADN afin de déclencher le GG-NER .

Dans les cellules XPC^{KD} et XP44RO, la centrine 2 est absente des zones nucléaires endommagées. Elle est absente du noyau quand la concentration de XPC est réduite ou absente, ce qui pourrait empêcher sa relocalisation sur l'ADN endommagé. Mais de nombreuses protéines présentant une localisation cytoplasmique ou cytoplasmique et nucléaire peuvent être importées dans le noyau après une exposition des cellules aux UV. C'est le cas pour XPA et DDB1 (Liu et al, 2000; Rademakers et al, 2003). Nous avons observé que bien que la centrine 2 soit localisée dans toute la cellule, il n'y a pas de mouvement massif de la centrine 2 cytoplasmique vers le noyau suite à une irradiation globale aux UVC. La centrine 2 qui est recrutée aux sites des lésions semble être la fraction nucléaire qui est déjà complexée à XPC (Figure 34).

Les protéines XPA et RPA ont une forte affinité pour l'ADN endommagé (Thoma et Vasquez, 2003). Elles ont longtemps été considérées comme le complexe initiateur du GG-NER (Wakasugi et Sancar, 1999). Il a ensuite été montré que XPC était la première protéine présente sur les dommages de l'ADN (Volker et al, 2001). XPC et la centrine 2 se localisent sur les sites des lésions de l'ADN induits par les UVC dans des cellules XPA^{KD}. Ceci confirme que le complexe XPC/Rad23B/centrine 2 est recruté en amont de XPA. De plus, le défaut de recrutement de la centrine 2 observé est bien spécifique de la réduction de XPC et non à un défaut global du NER (Figure 34).

Le variant XPC(W690S) mais pas XPC(W848A) présente un défaut de recrutement sur des photodommages

L'irradiation localisée aux UVC permet de montrer que des protéines se localisent sur des zones endommagées du noyau. Mais l'accumulation observée plusieurs minutes après l'irradiation ne permet pas de conclure sur l'efficacité du recrutement immédiat. En effet, le variant XPC(W690S) se localise sur les zones endommagées du noyau 30 minutes après une irradiation localisée aux UVC sans pour autant déclencher le NER (Yasuda et al, 2007). Cette modification est la seule substitution pathogène du domaine conservé de XPC, et la position de cet acide aminé est très conservée de l'homme à la levure. La substitution W690S déstabilise XPC et rend les cellules sensibles aux UVC. Ce variant interagit avec Rad23B, la centrine 2 et TFIIH, ce qui suggère que toute perturbation structurale causée par cette modification est très localisée. Bien que ce variant ait pu s'accumuler sur les sites des lésions de l'ADN, de manière dépendante de la présence de la protéine DDB2, il ne peut pas fixer l'ADN endommagé ni recruter efficacement XPA et XPB. DDB2 interagit avec les lésions indépendamment de XPC, et il y a une très faible interaction entre les 2 sur l'ADN endommagé (Luijsterburg, 2007). La présence de DDB2 permet donc de focaliser XPC dans les zones endommagées mais la présence de XPC(W690S) sur les zones irradiées aux UVC est insuffisante pour déclencher le NER. Ainsi, l'activité de liaison de XPC à l'ADN endommagé est essentielle pour le GG-NER. Nous avons donc souhaité utiliser une autre méthode afin de visualiser en continu le recrutement des protéines dès la formation des dommages nucléaires.

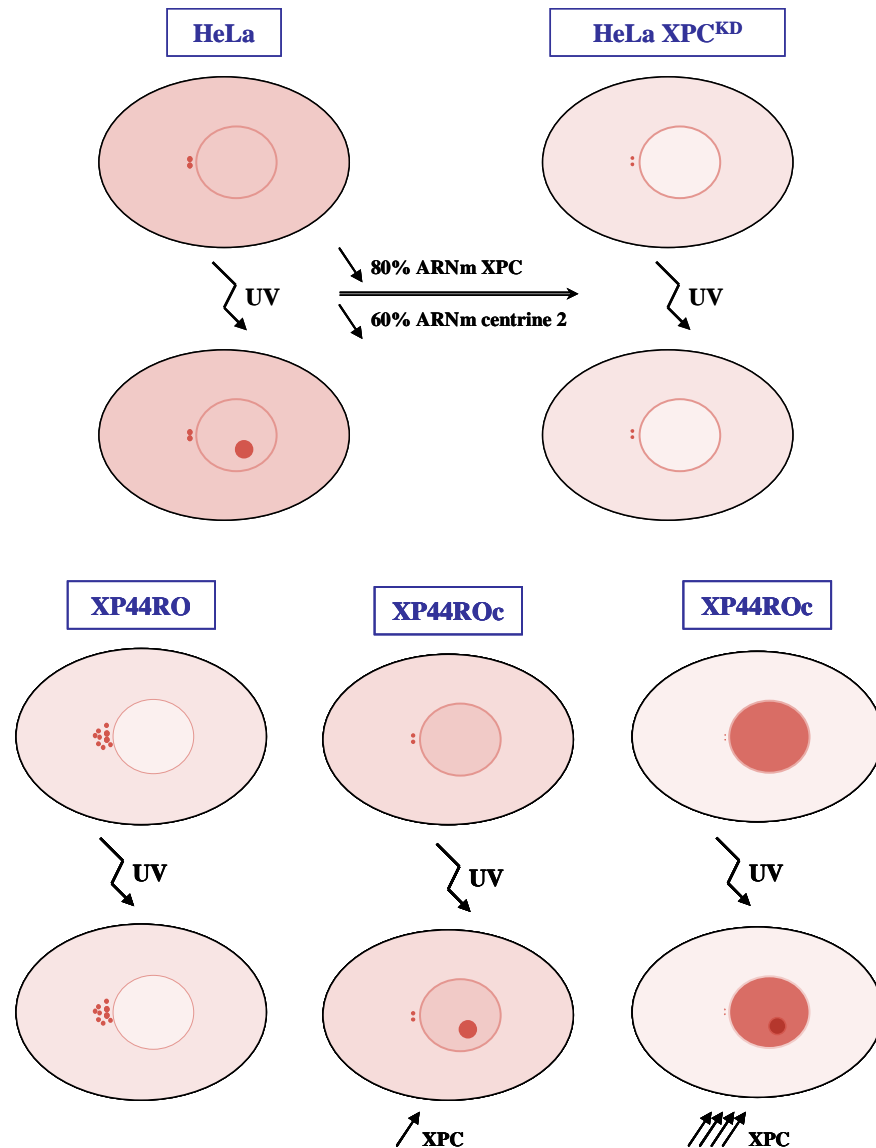


Figure 34. Conséquences de la modulation de la quantité de XPC sur la distribution subcellulaire et la localisation de la centrine 2 sur les dommages de l'ADN. Dans des cellules **HeLa**, la centrine 2 (représentée en **rouge**) présente une distribution homogène entre le cytoplasme et le noyau, et elle est concentrée dans les centrioles du centrosome et sur la membrane nucléaire. Après une irradiation localisée aux UVC, la centrine se localise sur les zones endommagées de l'ADN, complexée à XPC. Quand l'expression de XPC est réduite de 80% dans ces cellules, le taux de transcrits de la centrine 2 diminue de 60% et la quantité de protéine est également réduite. Il en résulte une forte réduction de la centrine 2 dans le noyau, et elle est faiblement détectable dans le cytoplasme et le centrosome. La centrine 2 est alors incapable de se focaliser sur les dommages de l'ADN. Dans des cellules **XP44RO** dérivées de patients XP-C, où la protéine XPC est défectueuse, la centrine 2 est détectée majoritairement dans et autour des centrioles. Son absence dans le noyau inhibe sa présence sur les sites des dommages de l'ADN. L'introduction de l'ADNc de XPC dans ces cellules entraîne l'augmentation de la quantité de protéine centrine 2 et sa localisation dans le noyau. La formation de complexes avec XPC permet sa localisation sur les dommages de l'ADN. Mais une trop forte concentration de XPC a deux conséquences qui pourraient être toxiques pour la cellule : la fraction centrosomale de la centrine 2 n'est plus détectable et la fraction nucléaire est très importante et reste présente proche des chromosomes pendant la mitose.

L'imagerie cellulaire *in vivo* permet de suivre les dynamiques de protéines d'intérêt fusionnées avec des étiquettes fluorescentes comme l'EGFP. En général les études de dynamique des processus nucléaires sont faites avec le photoblanchiment et donnent des informations sur la mobilité des protéines avant et après irradiation (Rademakers et al, 2003). Le couplage d'un micro-irradiateur laser (405 nm) à l'imagerie *in vivo* nous a permis de déterminer des cinétiques d'assemblage et de focalisation des protéines sur des zones endommagées des noyaux des cellules vivantes. Nous avons ainsi montré que le variant XPC(W690S) présentait un défaut de recrutement sur des photodommages immédiatement après l'impact du laser. Ceci confirme que bien que ce variant puisse s'accumuler lentement sur les zones endommagées de l'ADN, le recrutement immédiat est défectueux et perturbera l'arrivée de XPA et TFIIH qui sont normalement recrutés en aval de XPC. Cette technique est donc un outil efficace pour déterminer finement le recrutement des protéines du NER sur les lésions à 405 nm.

Le variant XPC(W848A) est recruté aussi efficacement que la protéine normale sur des zones irradiées localement aux UVC et après l'impact du laser, ce qui suggère que l'interaction entre XPC et la centrine 2 a un rôle modéré dans la reconnaissance des lésions *in vivo*. L'interaction entre XPC et la centrine 2 stimule la liaison de XPC à l'ADN endommagé *in vitro*. (Nishi et al, 2005). Mais *in vivo*, des cellules XP-C exprimant un variant de XPC n'interagissant pas avec la centrine 2 présentent une activité de réparation des 6,4-PP réduite par rapport à celles exprimant la protéine normale mais plus importante que les cellules XP-C. L'interaction entre XPC et la centrine 2 est donc non essentielle à la reconnaissance et à la réparation des lésions de l'ADN *in vivo*. Toutefois la centrine 2 n'est plus recrutée quand le variant XPC(W848A) est exprimé. Quel que soit son rôle dans la réponse aux dommages de l'ADN, l'interaction de la centrine 2 avec XPC permet sa localisation dans le noyau et sa focalisation sur les lésions de l'ADN. La formation de ce complexe pourra permettre d'autres activités de XPC et/ou induire un rôle direct de la centrine 2 dans le métabolisme cellulaire après la reconnaissance des lésions par XPC.

XPC peut ouvrir localement l'ADN au niveau de la lésion (Tapias et al, 2004). Mais le facteur TFIIH contient les deux hélicases XPB et XPD indispensables à l'ouverture de l'ADN et à la formation du complexe de pré-incision. Le complexe TFIIH est recruté par interaction directe avec XPC (Yokoi et al, 2000). Il a été détecté sur les dommages de l'ADN au moins 15 minutes après une irradiation (Volker et al, 2001). La centrine 2 se lie à XPC dans sa partie

C-terminale entre les résidus N847 et R863 qui sont situés dans le domaine d'interaction de XPC avec TFIIH (815-940 ; Uchida et al, 2002). La délétion de ce domaine réduit drastiquement l'efficacité du NER. Ce domaine est peu structuré et flexible, et la liaison de la centrine 2 à XPC pourrait stabiliser en partie cette région. Ceci suggère que la liaison du complexe XPC/centrine 2 à l'ADN endommagé pourrait modifier localement la structure de XPC et augmenter l'affinité de XPC à TFIIH. Cette nouvelle technique d'irradiation laser pourra permettre d'étudier plus précisément le recrutement de XPB ou XPA quand le variant XPC(W848A) est exprimé.

Le complexe XPC/centrine 2 se localise sur les dommages quand les concentrations des protéines Rad23 sont réduites

In vitro, la centrine 2 peut stimuler le GG-NER uniquement en coopération avec Rad23B (Araki et al, 2001). Nous avons observé que la centrine 2 était recrutée aux dommages dans des cellules HeLa Rad23A^{KD}, Rad23B^{KD} et D^{KD}, suggérant que les protéines Rad23A et Rad23B ne sont pas requises pour la localisation de la centrine 2 sur les sites des lésions induites par les UVC *in vivo*. Seule l'interaction entre XPC et la centrine 2 serait nécessaire à la localisation de la centrine 2 dans le noyau et sur les dommages de l'ADN.

Nous avons également observé que XPC se relocalisait sur les sites des lésions de l'ADN induites par les UVC dans les cellules HeLa Rad23^{KD}. De plus, le recrutement de XPC-EGFP au niveau de l'impact du laser est similaire aux cellules contrôle. Ces résultats suggèrent que les protéines Rad23 participent modérément, comme la centrine 2, à la reconnaissance des lésions par XPC dans les cellules HeLa. Dans les cellules Rad23B^{KD}, il reste environ 20% du transcrit Rad23B. Sachant que dans les cellules HeLa, Rad23B est présente en large excès par rapport à XPC, on peut envisager que la fraction restante de Rad23B permet un recrutement correct de XPC sur les lésions.

Identification de nouveaux facteurs induits après la reconnaissance des dommages par XPC : la centrine 2 et Rad23B

Suite à une exposition aux UV, différents facteurs et complexes protéiques sont recrutés afin d'éliminer les dommages et de favoriser la survie cellulaire. La cellule déclenche alors une série d'évènements qui impliquent l'induction de l'expression d'une centaine de gènes. On distingue trois catégories de gènes en fonction du temps de réponse : des gènes activés quelques minutes après l'irradiation (réponse précoce immédiate), des gènes induits après 2 à 4 heures (réponse précoce retardée) et des gènes induits tardivement au moins 4 heures après l'exposition (Bender et al, 1997). Il existerait donc différentes voies de transduction du signal activant la transcription après une exposition aux UV. Le gène kin17 est induit à un maximum 16 heures après une irradiation aux UVC de façon dépendante de la présence de XPC et indépendamment de p53 (Masson et al, 2003). XPC joue également un rôle important dans l'induction de nombreux gènes de régulation du cycle cellulaire et de l'apoptose après un traitement au cisplatine (Wang et al, 2004a). XPC est elle-même induite suite à une exposition aux UVC (Adimoolam et Ford, 2002). Nous avons observé que la présence de XPC entraînait l'induction de l'expression des gènes de ses deux partenaires Rad23B et centrine 2 après une irradiation aux UVC. XPC est donc impliquée dans la réponse cellulaire aux agents génotoxiques en induisant l'expression de nombreux gènes du métabolisme cellulaire dont ses deux partenaires. Une protéine de reconnaissance des dommages est en effet un bon candidat pour initialiser un processus de signalisation. La présence des lésions est ainsi insuffisante pour augmenter certains transcrits : c'est la reconnaissance des lésions par XPC qui serait à l'origine de l'activation transcriptionnelle de nombreux gènes de la réponse cellulaire à des agents génotoxiques comme les UV ou le cisplatine. Après un traitement au cisplatine, l'expression de gènes d'autres voies de réparation telles que le MMR et la réparation des DSB est affectée par l'absence de XPC, suggérant que le signal de reconnaissance des dommages de l'ADN produit par XPC pourrait être impliqué dans la régulation de différentes voies de réparation.

Rôle des protéines Rad23A et Rad23B dans la réponse cellulaire humaine aux UV

Les protéines Rad23A et Rad23B sont les homologues de mammifères de la protéine de levure rad23. Chez la levure, la protéine rad23 stimule le GG-NER en liant et en stabilisant rad4 sur l'ADN endommagé (Guzder et al, 1998 ; Jansen et al, 1998; Ortolan et al, 2004). Rad23 est également impliquée dans la dégradation des protéines en interagissant avec le protéasome (Lommel et al, 2000 ; Lommel et al, 2002). Chez les mammifères, Rad23B stimule le GG-NER *in vitro* en interagissant avec XPC (Sugasawa et al.; 1996; Batty et al, 2000). Rad23A peut également augmenter l'activité du GG-NER (Sugasawa et al., 1997). Ces résultats suggèrent que Rad23A pourrait compenser l'absence de Rad23B *in vitro*. Chez la souris, ces deux protéines ont effectivement des fonctions redondantes lors de la réparation de l'ADN et pour le contrôle de la dégradation des protéines (Ng et al., 2003; Okuda et al, 2004). En leur absence, XPC est dégradée par le protéasome 26S. Chez l'homme, plusieurs études suggèrent que les deux protéines auraient des fonctions distinctes aussi bien lors du GG-NER que dans le contrôle de la dégradation de protéines majeures de la réponse au stress comme p53 (Hsieh et al, 2005 ; Chen et Madura, 2008 ; Kaur et al, 2007). La seule étude menée chez l'homme pour distinguer les contributions de chaque protéine dans le métabolisme cellulaire après une irradiation aux UV a été réalisée après transfection transitoire de siRNA dans des cellules HfTA-1 dérivées de cellules HeLa (Hsieh et al, 2005). Nous nous sommes intéressés à l'effet à long terme de la réduction de l'expression des protéines Rad23A et Rad23B dans la réponse des cellules HeLa aux UV, en comparaison aux cellules XPC^{KD}.

La protéine Rad23B joue un rôle dans la survie cellulaire à long terme

Les cellules HeLa Rad23B^{KD} et D^{KD} sont sensibles aux UVC, mais de manière plus modérée que les cellules XPC^{KD}, ce qui confirme que la réduction de la quantité de XPC a l'effet le plus drastique sur la survie cellulaire (Biard et al, 2005 ; Biard, 2007). La forte sensibilité des cellules XPC^{KD} s'explique par le rôle majeur de XPC dans l'initiation du GG-NER. De plus, la diminution de XPC entraîne une réduction des transcrits centrine 2 et

Rad23A qui pourra contribuer aux effets drastiques observés dans les cellules XPC^{KD}. Les cellules Rad23A^{KD} ont une sensibilité aux UVC proche de celle des cellules contrôle. Ces données sont en accord avec les résultats rapportés par Hsieh et al (2005) qui suggèrent que la réduction de Rad23B seule peut entraîner une sensibilité des cellules aux UVC.

La réduction de XPC sensibilise les cellules à de fortes doses d'UV mais aussi de RI, ce qui est corrélé à une réduction de la réparation des DSB dans ces cellules (Despras et al, 2007). Les cellules Rad23B^{KD} et D^{KD} sont également sensibilisées suite à une exposition à des fortes doses de ces deux agents génotoxiques. XPC et Rad23B pourraient ainsi coopérer lors de la réponse cellulaire humaine aux UVC et aux RI, suggérant un rôle de Rad23B avec XPC dans la réparation des DSB.

L'analyse de la réparation de l'ADN viral irradié aux UVC par HCR a confirmé la contribution majeure de XPC dans la réparation des lésions induites par les UVC. Par contre, Rad23B a un effet très limité sur la capacité de réparation des cellules Rad23B^{KD} non irradiées, ce qui suggère que Rad23B n'est pas impliquée dans la réparation de l'ADN viral. Toutefois une pré-irradiation aux UVC des cellules Rad23B^{KD} 24 heures avant l'infection par le virus a entraîné une forte réduction de la capacité de ces cellules à réparer l'ADN viral. Ceci peut être expliqué par le fait que l'accumulation de XPC suite à une exposition aux UVC est réduite dans les cellules Rad23B^{KD}. Par contre le niveau basal de XPC est stable, ce qui peut être corrélé avec une reconnaissance immédiate et efficace des lésions, probablement aidée par DDB, et un taux de réparation par HCR normal.

Rad23B est impliquée dans la stabilisation du niveau basal de XPC chez la souris (Ng et al, 2003). Nous montrons que Rad23B pourrait stabiliser XPC uniquement après une irradiation aux UVC chez l'homme. Ceci suggère que la quantité de XPC détermine la survie cellulaire après une irradiation aux UVC. L'amélioration du recrutement en augmentant la quantité des protéines de réparation est d'ailleurs directement corrélée à l'efficacité du NER (Batty et al, 2000). Bien que XPC et la centrine 2 soient recrutées correctement sur les sites des lésions dans les cellules Rad23B^{KD}, ces résultats indiquent que Rad23B contribue à la survie cellulaire après un traitement avec un agent génotoxique en stabilisant XPC après la formation de dommages sur l'ADN. Le rôle de Rad23B dans la réponse des cellules humaines aux UVC pourrait également impliquer le contrôle de la stabilité/dégradation d'autres protéines importantes du métabolisme cellulaire.

La réduction transitoire de la quantité de Rad23B a pourtant permis de réduire la HCR de cellules non irradiées (Hsieh et al, 2005). La réduction à long terme a pu permettre aux cellules de s'adapter à la réduction de Rad23B au moins pour la réparation immédiate de l'ADN viral. De plus, la présence de DDB peut être suffisante pour permettre la reconnaissance des lésions par XPC dans ces cellules. La présence de DDB2 est d'ailleurs requise pour localiser XPC sur les CPD (Fitch et al, 2003). Comme pour la reconnaissance des dommages par XPC, on doit également considérer que 20% de la protéine Rad23B restante pourrait permettre une réparation efficace de l'ADN.

La protéine Rad23A est requise pour la réparation de l'ADN indépendamment de XPC

La survie des cellules Rad23A^{KD} après une exposition à des faibles doses d'UVC est similaire à celle des cellules contrôle, et ces cellules ne montrent pas de blocage particulier du cycle cellulaire suite à une irradiation à des fortes doses d'UVC et de RI. Ceci qui suggère que les lésions ont été réparées avant la réplication de l'ADN. Pourtant nous avons observé que les cellules Rad23A^{KD} non irradiées présentaient une réparation de l'ADN viral réduite mais plus importante que les cellules XPC^{KD}, ce qui suggère un lien direct entre la réparation de l'ADN et Rad23A. Le recrutement de XPC sur des photodommages est efficace dans les cellules Rad23A^{KD}, ce qui indique que la protéine Rad23A est requise pour le NER à une autre étape que la reconnaissance des lésions. Rad23A existe sous une forme non complexée à XPC dans des cellules HeLa (van der Spek et al, 1996), confirmant que Rad23A pourrait avoir un rôle dans la réparation de l'ADN indépendant de XPC. Dans les cellules HtTA-1, Rad23A co-précipite avec un facteur du protéasome 26S S5A et avec p53, indiquant que Rad23A pourrait être impliquée dans le NER par son interaction avec p53 (Hsieh et al, 2005). Le recrutement de XPB est dépendant de la présence de p53 sur les sites des lésions (Chang et al, 2008). De plus chez *S.cerevisiae*, rad23 permet la formation d'un complexe entre TFIIH et Rad14, l'homologue de XPA (Guzder et al, 1995). Tous ces résultats suggèrent que Rad23A pourrait jouer un rôle dans le recrutement de XPB sur les dommages de l'ADN, ce qui pourrait affecter la réparation de l'ADN sans inhiber la reconnaissance des lésions par XPC.

Il est intéressant de noter que 24 heures après un traitement des cellules Rad23A^{KD} aux UVC, celles-ci retrouvent une capacité de réparation de l'ADN viral similaire à celle des cellules contrôle. Ceci peut être corrélé à la survie cellulaire à long terme et à l'analyse du cycle cellulaire après une irradiation aux UVC ou aux RI. Rad23A pourrait ainsi jouer un rôle dans la réponse cellulaire aux UVC immédiatement après l'irradiation.

Des souris Rad23B^{-/-} présentent un développement embryonnaire anormal et un taux de mort intra-utérine élevée, alors que les souris Rad23A^{-/-} ont un phénotype normal, indiquant un rôle de Rad23B dans le développement et des fonctions des deux protéines dans des voies métaboliques distinctes (Ng et al, 2002 ; Ng et al, 2003). Les cellules de souris D^{KO} ont une survie cellulaire après une irradiation aux UV similaire aux cellules de souris XPC^{-/-} (Ng et al, 2003). Cet effet drastique a été observé après l'inactivation totale des deux protéines mRad23A et mRad23B contrairement aux cellules humaines^{KD} où la réduction des deux protéines est importante mais partielle. Toutefois il faut considérer que les cellules de rongeurs réparent peu efficacement les CPD lors du GG-NER à cause d'une très faible expression de p48 (Hanawalt et al, 2001). Elles sont donc plus dépendantes de la présence des protéines mRad23. Dans les cellules HeLa, la présence des protéines Rad23A et Rad23B est moins déterminant pour la reconnaissance des lésions. Par contre, contrairement à la souris, elles jouent chacune un rôle distinct et essentiel dans la réponse cellulaire après une irradiation aux UVC. Rad23B aurait un rôle plus en rapport avec XPC que Rad23A, qui jouerait un rôle dans la réparation de l'ADN après la reconnaissance des lésions par XPC.

Conclusion

Les UV agissent sur des cibles primaires dont les tyrosine-phosphatases, les ribosomes et l'ADN (Herrlich et al, 2008). Par des intermédiaires peu connus, des cascades de signalisation activent ensuite des protéine-kinases et leurs effecteurs. La réponse aux dommages induits par les ultraviolets implique ainsi une régulation coordonnée de nombreuses voies métaboliques qui déclencheront un arrêt du cycle cellulaire et la réparation des macromolécules endommagées, l'inflammation et l'apoptose. Tous ces mécanismes protègent l'organisme de conséquences délétères comme la prolifération cellulaire accrue et l'immunosuppression.

Au cours de ma thèse, j'ai montré l'existence d'un hétérotrimère multifonctionnel, composé des protéines XPC, Rad23B et centrine 2, qui participe à un processus cellulaire précoce lié à la présence de lésions sur l'ADN. La protéine XPC joue un rôle majeur en localisant le complexe sur l'ADN. L'existence de cet hétérotrimère ancré à la chromatine permet son intervention immédiatement après la formation des lésions pour déclencher le GG-NER. L'expression de XPC est alors induite et la protéine est stabilisée par Rad23B, ce qui est primordial pour la survie cellulaire. XPC fait également partie d'un système de signalisation qui entraîne l'induction de l'expression de certains gènes du métabolisme cellulaire après une irradiation aux UVC, dont la centrine 2 et Rad23B. Il pourrait ainsi exister une boucle de régulation entre XPC et Rad23B afin de maintenir ces protéines à un niveau optimal. XPC participe au contrôle du niveau basal de la protéine centrine 2 et intervient aussi dans l'augmentation de l'expression du gène centrine 2 après une irradiation aux UVC. XPC permet également la localisation de la centrine 2 dans le noyau des cellules et les lésions de l'ADN par une interaction directe, et maintient ainsi un équilibre entre le centrosome et le noyau. La quantité et la localisation de ces différentes protéines sont donc finement régulées,

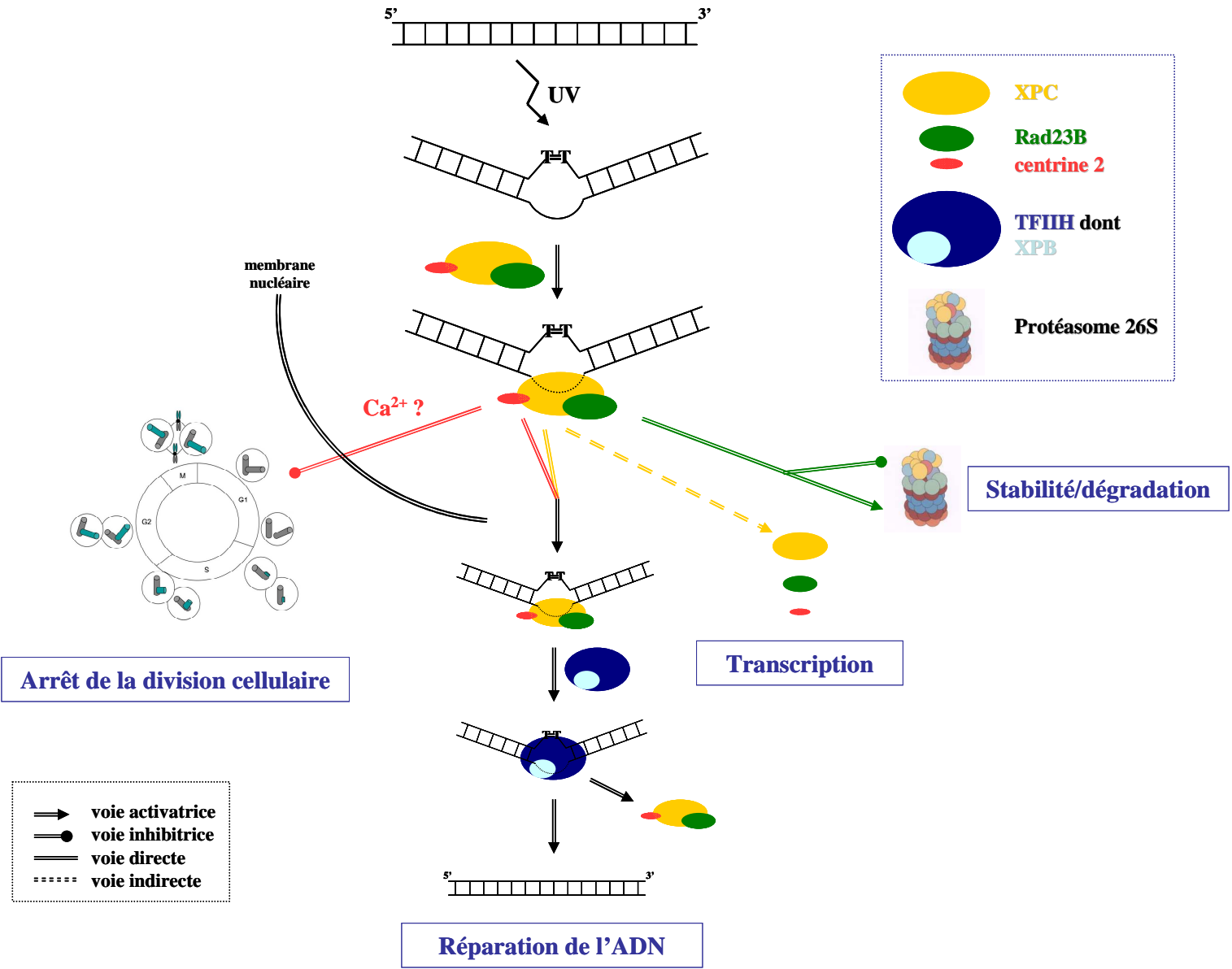
suggérant qu'une légère modulation de ces paramètres pourrait affecter le métabolisme cellulaire.

Les protéines Rad23B et centrine 2 peuvent stimuler le GG-NER *in vitro* en coopération avec XPC. Toutefois la reconnaissance immédiate des dommages par XPC est fonctionnelle *in vivo* quand l'interaction entre XPC et la centrine 2 est inhibée ou quand la quantité de Rad23B est réduite. Compte-tenu de leur localisation précoce sur les lésions de l'ADN et des rôles distincts des trois protéines, nous proposons que la formation de ce complexe permet le déclenchement rapide d'une réponse des cellules suite à une irradiation aux UV en coordonnant différentes voies métaboliques : la régulation du cycle cellulaire et la réponse au Ca^{2+} par la centrine 2, le contrôle stabilité/dégradation de protéines dont XPC par Rad23B et la réparation proprement dite et l'induction de l'expression de gènes par XPC (Figure 35).

XPC reconnaît une grande variété de lésions, qui sont induites par les UV ou des carcinogènes chimiques (Gillet et Schäfer, 2006 ; Table 1). De plus XPC serait impliquée dans différentes voies de réparation comme le BER (Shimizu et al, 2003). L'ensemble de ces observations nous permet de suggérer que ce complexe multifonctionnel a un rôle plus vaste que dans la réponse cellulaire aux UV.

Figure 35. Modèle d'initiation de la réponse aux UV par le complexe XPC/Rad23B/centrine 2. L'hétérotrimère existe en conditions basales ancré à la chromatine. Il est rapidement relocalisé sur les dommages induits par les UV. XPC favorise alors le recrutement de TFIIH par une interaction directe avec XPB probablement facilitée par la présence de la centrine 2. Le déclenchement du NER permet la réparation de la lésion. Le signal de reconnaissance généré par XPC active une voie transcriptionnelle de nombreux gènes de réponse aux dommages de l'ADN, dont Rad23B et la centrine 2. L'expression de XPC est également induite et la protéine est stabilisée par

Rad23B, ce qui favorise la survie cellulaire. Rad23B joue également un rôle dans la stabilité/dégradation d'autres facteurs du métabolisme cellulaire nécessaires au maintien de la stabilité génétique comme p53. Enfin, la présence de la centrine 2 sur les sites des dommages pourrait permettre d'arrêter la division cellulaire en inhibant le cycle du centrosome



Perspectives

La protéine XPC, modifiée et incapable de participer à la réparation de l'ADN, est responsable du syndrome XP-C, le plus fréquent des syndromes XP. Les patients atteints de ce syndrome ont un risque de développement de cancer de la peau multiplié par mille mais développent aussi des cancers internes. Des polymorphismes du gène XP-C ont été associés à un risque de prédisposition au cancer de la peau (Khan et al, 2002) et à d'autres types de cancer (Francisco et al, 2008). Dans certains cas les variants réparent correctement l'ADN comme la variation K939Q (Khan et al, 2000). C'est pourtant un polymorphisme commun (38%) du gène XP-C qui a été associé à une augmentation du risque de cancer de la vessie (Sanyal et al, 2004). Il existe également une corrélation entre la diminution du niveau de l'expression de XPC et la progression du cancer de la vessie (Chen et al, 2007). De plus, XPC est inactivée dans certaines lignées cellulaires issues de tumeurs pulmonaires (Wu et al, 2007). Des souris XPC^{-/-} ont d'ailleurs une fréquence élevée de développement de cancer du poumon en comparaison à des souris XPA^{-/-} (Melis et al, 2008). Tous ces résultats suggèrent un rôle complexe de XPC dans le métabolisme cellulaire et la tumorigenèse. De nombreuses tumeurs sont aneuploïdes et présentent des anomalies du centrosome. Ainsi, de nombreuses protéines de régulation du cycle cellulaire sont des éléments-clés du centrosome, qui sert également de plateforme au protéasome. La séparation des centrosomes est d'ailleurs bloquée suite à la formation de dommages à l'ADN (Fletcher et al, 2004). XPC interagit avec la centrine 2, l'importe dans le noyau et maintient un équilibre entre le noyau et le centrosome. Cette interaction directe permet la localisation de la centrine 2 sur les dommages de l'ADN immédiatement après une irradiation. Rad23B, le troisième composant de l'hétérotrimère permet de stabiliser XPC après l'irradiation et d'augmenter la probabilité de survie cellulaire. Afin de conforter ce scénario, nous devrions préciser par la suite:

- si les recrutements de XPB et XPD ont lieu quand XPC est incapable d'interagir avec la centrine 2 ou quand les concentrations des protéines Rad23A et/ou Rad23B sont réduites.

- si un stress génotoxique dans des cellules déficientes en XPC ou exprimant le variant XPC(W848A) peut perturber la séparation des centrosomes.

- déterminer *in vivo* le rôle du Ca^{2+} dans l'interaction entre XPC et la centrine 2 et évaluer les conséquences éventuelles dans la réponse cellulaire aux UV.

- déterminer la nature physique de l'interaction entre XPC et AKAP450 dans les cellules humaines et les conséquences pour la structure du centrosome et la division cellulaire.

Préciser les bases physico-chimiques des interactions entre XPC, la centrine 2 et Rad23B dans la réponse des cellules humaines aux agents génotoxiques pourrait permettre d'expliquer en partie la tumorigenèse exacerbée des patients XP-C et la prédisposition à certains types de cancers.

Matériel et Méthodes

La plupart des techniques sont récapitulées dans les deux articles. Certaines sont détaillées ici, ainsi que d'autres techniques complémentaires.

Fractionnement cellulaire

Toutes les étapes du fractionnement sont réalisées à 4°C, et les tampons utilisés contiennent un cocktail d'anti-protéase (« Complete protease inhibitor cocktail », Roche). La méthode utilisée est inspirée de Rapic-Otrin et al. Les cellules sont ensemencées la veille pour atteindre environ 70-80% de confluence. Puis les cellules sont trypsinées, comptées puis centrifugées 5 minutes à 1200 rpm. Le culot est rincé au PBS et centrifugé à nouveau. La moitié des cellules est isolée, resuspendue dans du PBS puis, après une nouvelle centrifugation, reprise dans 100 µL pour 1.10^6 cellules de tampon hypotonique (10 mM HEPES, pH 7.9, 10 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂). C'est l'extrait total (WCE, « Whole Cell Extract »). Le culot restant est lysé dans le tampon hypotonique + triton 0.1%. Après une centrifugation (500 g, 5 minutes), le surnageant S1 est centrifugé à 13000 g pendant 5 minutes. Le nouveau surnageant S2 contient les protéines cytoplasmiques solubles. Les étapes suivantes commencent toutes par une étape de resuspension du culot dans un tampon suivie d'une centrifugation durant 5 minutes à 500 g. Chaque surnageant est ensuite délicatement prélevé. Les protéines cytoplasmiques restantes sont extraites dans un tampon sucrose isotonique (50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 250 mM sucrose, 5 mM MgCl₂), le surnageant est appelé STM. La membrane nucléaire est lysée dans un tampon « Low Salt » (10 mM Tris-HCl, pH 7.4, 0.2 mM MgCl₂) + triton 1%, générant la fraction de protéines nucléaires solubles TW (« Triton Wash »). Le culot est ensuite lavé dans ce même tampon afin de libérer les protéines nucléaires solubles restantes (fraction LS). Les protéines sont enfin extraites dans le

tampon LS contenant trois concentrations croissantes de NaCl (0,3, 0,5 et 2 M) afin de libérer les protéines faiblement (fraction 0,3), moyennement (fraction 0,5) et fortement attachées à la chromatine (fraction 2).

Irradiation localisée aux UVC

Pour visualiser la localisation de protéines aux sites des lésions induites par les UVC, nous avons utilisé la méthode de Katsumi et al (2001). Les cellules sontensemencées la veille de l'irradiation sur des lamelles en verre. Le jour-même, les lamelles sont rincées dans du PBS, puis un filtre de polycarbonate (Millipore) contenant des pores de 5 µm de diamètre est déposé. Les pores sont localisés de manière aléatoire sur le filtre. Les cellules sont irradiées à 100 J/m² à 254 nm (UVC), puis ré-incubées 10 minutes à 37°C. Elles sont ensuite fixées 15 minutes à température ambiante dans du paraformaldéhyde 4% (marquage CPD ou XPC) ou 3 minutes à -20°C dans du méthanol froid (marquage centrine 2 et γ-tubuline), et rincées trois fois dans du PBS avant de réaliser le marquage immunocytochimique.

qPCR

Les ARN sont isolés avec le kit « RNeasy Plus mini kit » (Qiagen). Pour la transcription reverse, 1 µg d'ARN (qsp 12 µL H₂O) est mélangé avec 100 ng de random primer et 1 µL de dNTP 10 mM, et incubé pendant 5 minutes à 65°C dans un thermobloc. Un mix contenant 4 µL de 5X first strand buffer, 1 µL de DTT 0.1 M et 1 µL de reverse transcriptase Superscript III (Invitrogen) est ensuite ajouté. Le mélange est incubé au thermocycleur selon le programme : 5 minutes à 25°C, 50 minutes à 50°C et 15 minutes à 70°C. Les ADNc sont dilués au 1/10^{ème} puis conservé à -80°C. Les amorces utilisées pour la PCR sont : XPC-direct: 5'-TCTTCGGAGGGCGATGAAAC et XPC-reverse: 5'-ATGATGGACAGGCCAATAGC; HsCen2-direct: 5'-ATCTGAAACGCGTGGCCAAG et HsCen2-reverse: 5'-TTCATGATGCGCAGGAAGCTC; Rad23A-direct: 5'-GAACATGCGGCAGGTGATTC et Rad23A-reverse: 5'-TCCTGGTGCCGGCTGATTTG; Rad23B-direct: 5'-ACATCGGGTGATTCTTCTCG et Rad23B-reverse: 5'-

GCTCTCAGGGCTGCAATTAC; Kin17-direct : 5'-ACTTCTCAGGAGACGCTTTG et Kin17-reverse : 5'- CACTGAGTGGCATTCATGTG ; p21-direct : 5'-ATCCCGTGTTCTCCTTT et p21-reverse : 5'- GCTGGCATGAAGCC ; β -actin-direct: 5'-ACTCTTCCAGCCTTCCTTCC et β -actin-reverse: 5'-GTTGGCGTACAGGTCTTTGC. Les ADNc sont dilués au $1/10^{\text{ème}}$, et 4 μ L sont mélangés avec 16 μ L d'un mix contenant 10 μ L d'un supermix contenant du SybrGreen (Invitrogen, UK), 0,4 μ L de chaque amorce (10 μ M) et 5,6 μ L d'eau. La PCR est réalisée avec le programme 7300 system software selon les étapes suivantes : 2 minutes à 50°C, 2 minutes à 95°C, 15 secondes à 95°C et 1 minute à 60°C. Les trois dernières étapes sont répétées 40 fois et la fluorescence est mesurée à chaque étape à 60°C. La quantité relative d'ADN a été déterminée selon la méthode de Livak et al (2001) : la variation d'expression= $Q=2^{-\Delta\Delta C_T}$ où C_T est le cycle seuil déterminé par le programme. $\Delta\Delta C_T = [(C_{T,\text{cible}}-C_{T,\text{actine}}) \text{ expérience test}] - [(C_{T,\text{cible}}-C_{T,\text{actine}}) \text{ expérience contrôle}]$. La significativité des différences mesurées a été déterminée par un test de Student avec * $P < 0.05$; ** $P < 0.001$.

Anticorps

Nous avons obtenu des anticorps anti-XPC chez la souris (voir article 1) et le lapin. La majorité des autres anticorps utilisés ont été obtenus par J.Salisbury (Mayo clinic, Minnesota, USA) et principalement par l'équipe de M.Bornens (Institut Curie, Paris) avec qui nous avons collaboré pour réaliser les différents marquages de protéines centrosomales dans les cellules XPC^{KD}. Les anticorps et leurs dilutions respectives sont présentés dans la table ci-dessous.

Les anticorps secondaires utilisés pour coupler les anticorps primaires à des fluorochromes sont : anti-souris-Cy3 (Jackson, rouge ; dilution 1/300) et anti-lapin-Alexa 488 (Invitrogen,vert ; dilution 1/1000). Pour le Western blot, des anticorps anti-souris et anti-lapin couplés à la peroxidase ont été utilisés pour la détection de la chimioluminescence (Ge Helathcare).

Cible	Animal	Western blot	ICC	Provenance
XPC	souris	1/1000	1/100	Laboratoire
XPC	lapin		1/100	Laboratoire
centrine 20H5	souris		1/1000	J.Salisbury
centrine 2	lapin	1/2000	1/1000	M.Bornens
γ -tubuline	lapin	1/2000	1/1000	M.Bornens
centrine 3	lapin	1/2000	1/500	M.Bornens
ninéine	lapin		1/100	M.Bornens
cnap-1	souris		1/100	M.Bornens
AKAP450 (a24)	lapin		1/2000	M.Bornens
α -tubuline	souris	1/2000		Sigma
CPD (KTM53)	souris		1/80	Kamyia
6,4-PP (KTM50)	souris		1/40	Kamyia

Imagerie confocale

Les images de microscopie ont été réalisées à la plateforme d' « Imagerie Cellulaire et Tissulaire » de l'Institut Curie d'Orsay. Elles ont été obtenues avec un microscope confocal Leica SP5 composé d'un un statif DMI6000 et d'un objectif 63x/1.4. La détection des fluorochromes est obtenue à l'aide d'un laser argon (488 nm pour l'Alexa 488) et d'une diode 536 nm pour le Cy3. Le DAPI est révélé par une diode 405 nm. Chaque image présentée correspond à la moyenne de quatre images. Pour certaines images, le champ a été zoomé 6 fois. Le traitement d'images a été réalisé à l'aide du logiciel gratuit Image J (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>).

Microirradiation laser

La méthode que nous avons mise en place à la plateforme d' « Imagerie Cellulaire et Tissulaire » à l'Institut Curie d'Orsay utilise la micro-irradiation laser à 405 nm couplée à l'imagerie *in vivo*. La microirradiation-laser à 405 nm a été utilisée pour étudier le

recrutement sur les photodommages de WRN et de protéines de la machinerie de synthèse réparatrice de l'ADN comme PCNA et RFC (Lan et al, 2005 ; Perucca et al, 2006 ; Hashiguchi et al, 2007). L'enregistrement d'une séquence d'images permet de déterminer des cinétiques de recrutement immédiatement après l'irradiation sur une zone nucléaire de taille réduite et constante. L'irradiation dans le visible à 405 nm entraîne la formation de cassures simple et double-brin et des dommages de base (Lan et al, 2005). L'ADN absorbe très peu au-delà de 320 nm. Par exemple, la plupart des effets endommageant l'ADN induits par les UVA sont indirects et impliquent des réactions de photosensibilisation (Cadet et al, 2005). Les UVA entraînent la formation de lésions oxydatives dont la plus importante, mais présente en faibles quantités, est la 8-oxoGua. Ils induisent aussi des CPD dont la majorité sont des dimères TT. Il n'y a pas de formation de 6,4-PP, qui sont les lésions les mieux reconnues par XPC en comparaison aux CPD. Dans les UVA1 à 364 nm, c'est la formation des CPD et non des dommages oxydatifs qui sont génotoxiques pour la peau exposée (Ikehata et al, 2008). La lumière visible peut induire la formation de dommages de l'ADN (Edström et al, 2001). La division entre les UVA1 et le visible étant arbitraire, les effets photobiologiques des UVA1 et de la lumière visible proche de 400 nm pourraient être semblables (Mahmoud et al, 2008).

Les cellules sont transfectées avec 1 µg de plasmide et 2 µL de lipofectamine (Invitrogen). La microirradiation laser est réalisée 24 heures après transfection des cellules sur le même microscope que précédemment, sous un environnement contrôlé à 37°C. Deux images sont acquises avant chaque enregistrement grâce au laser argon 488 nm pour la GFP. La diode laser 405 nm est réglée à sa puissance maximale, puis elle est focalisée durant 1 seconde sur un point précis du noyau de taille constante. Puis une image est obtenue à intervalle régulier de 2,365 secondes (intervalle de temps minimum pour enchaîner les prises d'images) pendant environ 150 secondes. Pour déterminer les cinétiques de recrutement des protéines aux photodommages, une macro a été écrite pour automatiser les extractions d'intensités de fluorescence à partir des images. Tout d'abord, les contours de la région de l'impact du laser sont déterminés en utilisant la fonction « seuil » et « baguette magique » d'Image J. Puis sont déterminées les intensités de fluorescence de deux régions d'intérêt (ROI, « Region Of Interest ») correspondant à la zone du photodommage et le noyau excluant le spot servant à corriger l'intensité de fluorescence du photoblanchiment. L'intensité de fluorescence de la zone du dommage est normalisée à 1 avant l'impact.

Références bibliographiques

A

Adimoolam, S., and Ford, J. M. (2002). p53 and DNA damage-inducible expression of the xeroderma pigmentosum group C gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 12985-12990.

Araki, M., Masutani, C., Takemura, M., Uchida, A., Sugasawa, K., Kondoh, J., Ohkuma, Y., and Hanaoka, F. (2001). Centrosome protein centrin 2/caltractin 1 is part of the xeroderma pigmentosum group C complex that initiates global genome nucleotide excision repair. *J Biol Chem* 276, 18665-18672.

Asahina, H., Kuraoka, I., Shirakawa, M., Morita, E. H., Miura, N., Miyamoto, I., Ohtsuka, E., Okada, Y., and Tanaka, K. (1994). The XPA protein is a zinc metalloprotein with an ability to recognize various kinds of DNA damage. *Mutat Res* 315, 229-237.

B

Badano, J. L., Teslovich, T. M., and Katsanis, N. (2005). The centrosome in human genetic disease. *Nat Rev Genet* 6, 194-205.

Batty, D., Ropic-Otrin, V., Levine, A. S., and Wood, R. D. (2000). Stable binding of human XPC complex to irradiated DNA confers strong discrimination for damaged sites. *J Mol Biol* 300, 275-290.

Bender, K., Blattner, C., Knebel, A., Iordanov, M., Herrlich, P., and Rahmsdorf, H. J. (1997). UV-induced signal transduction. *J Photochem Photobiol B* 37, 1-17.

Bettencourt-Dias, M., and Glover, D. M. (2007). Centrosome biogenesis and function: centrosomes brings new understanding. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8, 451-463.

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.

Biard, D. S. (2007). Untangling the relationships between DNA repair pathways by silencing more than 20 DNA repair genes in human stable clones. *Nucleic Acids Res* 35, 3535-3550.

Biggins, S., Ivanovska, I., and Rose, M. D. (1996). Yeast ubiquitin-like genes are involved in duplication of the microtubule organizing center. *J Cell Biol* 133, 1331-1346.

Binz, S. K., Sheehan, A. M., and Wold, M. S. (2004). Replication protein A phosphorylation and the cellular response to DNA damage. *DNA Repair (Amst)* 3, 1015-1024.

Bornens, M. (2002). Centrosome composition and microtubule anchoring mechanisms. *Curr Opin Cell Biol* 14, 25-34.

Bregman, D. B., Halaban, R., van Gool, A. J., Henning, K. A., Friedberg, E. C., and Warren, S. L. (1996). UV-induced ubiquitylation of RNA polymerase II: a novel modification deficient in Cockayne syndrome cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 11586-11590.

Brignone, C., Bradley, K. E., Kisselev, A. F., and Grossman, S. R. (2004). A post-ubiquitylation role for MDM2 and hHR23A in the p53 degradation pathway. *Oncogene* 23, 4121-4129.

C

Cadet, J., Sage, E., and Douki, T. (2005). Ultraviolet radiation-mediated damage to cellular DNA. *Mutat Res* 571, 3-17.

Chang, Y. C., Jan, K. Y., Cheng, C. A., Liao, C. B., and Liu, Y. C. (2008). Direct involvement of the tumor suppressor p53 in nucleotide excision repair. *DNA Repair (Amst)* 7, 751-761.

Chen, X., Cheung, S. T., So, S., Fan, S. T., Barry, C., Higgins, J., Lai, K. M., Ji, J., Dudoit, S., Ng, I. O., *et al.* (2002). Gene expression patterns in human liver cancers. *Mol Biol Cell* 13, 1929-1939.

Chen, Z., Xu, X. S., Yang, J., and Wang, G. (2003). Defining the function of XPC protein in psoralen and cisplatin-mediated DNA repair and mutagenesis. *Carcinogenesis* 24, 1111-1121.

Chen, L., and Madura, K. (2006). Evidence for distinct functions for human DNA repair factors hHR23A and hHR23B. *FEBS Lett* 580, 3401-3408.

Chen, Z., Yang, J., Wang, G., Song, B., Li, J., and Xu, Z. (2007). Attenuated expression of xeroderma pigmentosum group C is associated with critical events in human bladder cancer carcinogenesis and progression. *Cancer Res* 67, 4578-4585.

Chen, L., and Madura, K. (2008). Centrin/Cdc31 is a novel regulator of protein degradation. *Mol Cell Biol* 28, 1829-1840.

Christmann, M., Tomicic, M. T., Roos, W. P., and Kaina, B. (2003). Mechanisms of human DNA repair: an update. *Toxicology* 193, 3-34.

Cleaver, J. E. (1968). Defective repair replication of DNA in xeroderma pigmentosum. *Nature* 218, 652-656.

Cleaver, J. E. (2005). Cancer in xeroderma pigmentosum and related disorders of DNA repair. *Nat Rev Cancer* 5, 564-573.

Colton, S. L., Xu, X. S., Wang, Y. A., and Wang, G. (2006). The involvement of ataxia-telangiectasia mutated protein activation in nucleotide excision repair-facilitated cell survival with cisplatin treatment. *J Biol Chem* 281, 27117-27125.

Craig, T. A., Benson, L. M., Bergen, H. R., 3rd, Venyaminov, S. Y., Salisbury, J. L., Ryan, Z. C., Thompson, J. R., Sperry, J., Gross, M. L., and Kumar, R. (2006). Metal-binding properties of human centrin-2 determined by micro-electrospray ionization mass spectrometry and UV spectroscopy. *J Am Soc Mass Spectrom* 17, 1158-1171.

Crick, F. (1974). The double helix: a personal view. *Nature* 248, 766-769.

- D'Assoro, A. B., Busby, R., Acu, I. D., Quatraro, C., Reinholz, M. M., Farrugia, D. J., Schroeder, M. A., Allen, C., Stivala, F., Galanis, E., and Salisbury, J. L. (2008). Impaired p53 function leads to centrosome amplification, acquired ERalpha phenotypic heterogeneity and distant metastases in breast cancer MCF-7 xenografts. *Oncogene* 28, 3901-3911.
- D'Assoro, A. B., Busby, R., Suino, K., Delva, E., Almodovar-Mercado, G. J., Johnson, H., Folk, C., Farrugia, D. J., Vasile, V., Stivala, F., and Salisbury, J. L. (2004). Genotoxic stress leads to centrosome amplification in breast cancer cell lines that have an inactive G1/S cell cycle checkpoint. *Oncogene* 23, 4068-4075.
- D'Assoro, A. B., Lingle, W. L., and Salisbury, J. L. (2002). Centrosome amplification and the development of cancer. *Oncogene* 21, 6146-6153.
- de Boer, J., and Hoeijmakers, J. H. (2000). Nucleotide excision repair and human syndromes. *Carcinogenesis* 21, 453-460.
- de Laat, W. L., Appeldoorn, E., Sugawara, K., Weterings, E., Jaspers, N. G., and Hoeijmakers, J. H. (1998). DNA-binding polarity of human replication protein A positions nucleases in nucleotide excision repair. *Genes Dev* 12, 2598-2609.
- Delgehr, N., Sillibourne, J., and Bornens, M. (2005). Microtubule nucleation and anchoring at the centrosome are independent processes linked by ninein function. *J Cell Sci* 118, 1565-1575.
- den Dulk, B., Sun, S. M., de Ruijter, M., Brandsma, J. A., and Brouwer, J. (2006). Rad33, a new factor involved in nucleotide excision repair in *Saccharomyces cerevisiae*. *DNA Repair (Amst)* 5, 683-692.
- den Dulk, B., van Eijk, P., de Ruijter, M., Brandsma, J. A., and Brouwer, J. (2008). The NER protein Rad33 shows functional homology to human Centrin2 and is involved in modification of Rad4. *DNA Repair (Amst)* 7, 858-868.
- D'Errico, M., Parlanti, E., Teson, M., de Jesus, B. M., Degan, P., Calcagnile, A., Jaruga, P., Bjoras, M., Crescenzi, M., Pedrini, A. M., *et al.* (2006). New functions of XPC in the protection of human skin cells from oxidative damage. *Embo J* 25, 4305-4315.
- Despras, E., Pfeiffer, P., Salles, B., Calsou, P., Kuhfittig-Kulle, S., Angulo, J. F., and Biard, D. S. (2007). Long-term XPC silencing reduces DNA double-strand break repair. *Cancer Res* 67, 2526-2534.
- Diaz-Martinez, L. A., Kang, Y., Walters, K. J., and Clarke, D. J. (2006). Yeast UBL-UBA proteins have partially redundant functions in cell cycle control. *Cell Div* 1, 28.
- Dip, R., Camenisch, U., and Naegeli, H. (2004). Mechanisms of DNA damage recognition and strand discrimination in human nucleotide excision repair. *DNA Repair (Amst)* 3, 1409-1423.
- Douki, T., Perdiz, D., Grof, P., Kuluncsics, Z., Moustacchi, E., Cadet, J., and Sage, E. (1999). Oxidation of guanine in cellular DNA by solar UV radiation: biological role. *Photochem Photobiol* 70, 184-190.
- Doxsey, S. (2001). Re-evaluating centrosome function. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2, 688-698.
- Doxsey, S., Zimmerman, W., and Mikule, K. (2005). Centrosome control of the cell cycle. *Trends Cell Biol* 15, 303-311.

Duensing, S., Duensing, A., Crum, C. P., and Munger, K. (2001). Human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein-induced abnormal centrosome synthesis is an early event in the evolving malignant phenotype. *Cancer Res* 61, 2356-2360.

Duensing, A., Liu, Y., Perdreau, S. A., Kleylein-Sohn, J., Nigg, E. A., and Duensing, S. (2007). Centriole overduplication through the concurrent formation of multiple daughter centrioles at single maternal templates. *Oncogene* 26, 6280-6288.

E

Edstrom, D. W., Porwit, A., and Ros, A. M. (2001). Effects on human skin of repetitive ultraviolet-A1 (UVA1) irradiation and visible light. *Photodermatol Photoimmunol Photomed* 17, 66-70.

Errabolu, R., Sanders, M. A., and Salisbury, J. L. (1994). Cloning of a cDNA encoding human centrin, an EF-hand protein of centrosomes and mitotic spindle poles. *J Cell Sci* 107 (Pt 1), 9-16.

F

Feliciello, A., Gottesman, M. E., and Avvedimento, E. V. (2001). The biological functions of A-kinase anchor proteins. *J Mol Biol* 308, 99-114.

Fischer, T., Rodriguez-Navarro, S., Pereira, G., Racz, A., Schiebel, E., and Hurt, E. (2004). Yeast centrin Cdc31 is linked to the nuclear mRNA export machinery. *Nat Cell Biol* 6, 840-848.

Fisk, H. A., Mattison, C. P., and Winey, M. (2003). Human Mps1 protein kinase is required for centrosome duplication and normal mitotic progression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 14875-14880.

Fitch, M. E., Cross, I. V., and Ford, J. M. (2003). p53 responsive nucleotide excision repair gene products p48 and XPC, but not p53, localize to sites of UV-irradiation-induced DNA damage, in vivo. *Carcinogenesis* 24, 843-850.

Fletcher, L., Cerniglia, G. J., Nigg, E. A., Yend, T. J., and Muschel, R. J. (2004). Inhibition of centrosome separation after DNA damage: a role for Nek2. *Radiat Res* 162, 128-135.

Ford, J. M., and Hanawalt, P. C. (1995). Li-Fraumeni syndrome fibroblasts homozygous for p53 mutations are deficient in global DNA repair but exhibit normal transcription-coupled repair and enhanced UV resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 8876-8880.

Ford, J. M. (2005). Regulation of DNA damage recognition and nucleotide excision repair: another role for p53. *Mutat Res* 577, 195-202.

Fousteri, M., Vermeulen, W., van Zeeland, A. A., and Mullenders, L. H. (2006). Cockayne syndrome A and B proteins differentially regulate recruitment of chromatin remodeling and repair factors to stalled RNA polymerase II in vivo. *Mol Cell* 23, 471-482.

Fousteri, M., and Mullenders, L. H. (2008). Transcription-coupled nucleotide excision repair in mammalian cells: molecular mechanisms and biological effects. *Cell Res* 18, 73-84.

Francisco, G., Menezes, P. R., Eluf-Neto, J., and Chammas, R. (2008). XPC polymorphisms play a role in tissue-specific carcinogenesis: a meta-analysis. *Eur J Hum Genet* 16, 724-734.

Friedberg, E. C. (2001). How nucleotide excision repair protects against cancer. *Nat Rev Cancer* 1, 22-33.

Friedberg, E. C. (2004). The discovery that xeroderma pigmentosum (XP) results from defective nucleotide excision repair. *DNA Repair (Amst)* 3, 183, 195.

Fry, A. M., Mayor, T., Meraldi, P., Stierhof, Y. D., Tanaka, K., and Nigg, E. A. (1998). C-Nap1, a novel centrosomal coiled-coil protein and candidate substrate of the cell cycle-regulated protein kinase Nek2. *J Cell Biol* 141, 1563-1574.

Fukasawa, K. (2007). Oncogenes and tumour suppressors take on centrosomes. *Nat Rev Cancer* 7, 911-924.

G

Gavet, O., Alvarez, C., Gaspar, P., and Bornens, M. (2003). Centrin4p, a novel mammalian centrin specifically expressed in ciliated cells. *Mol Biol Cell* 14, 1818-1834.

Gillet, L. C., and Scharer, O. D. (2006). Molecular mechanisms of mammalian global genome nucleotide excision repair. *Chem Rev* 106, 253-276.

Glockzin, S., Ogi, F. X., Hengstermann, A., Scheffner, M., and Blattner, C. (2003). Involvement of the DNA repair protein hHR23 in p53 degradation. *Mol Cell Biol* 23, 8960-8969.

Gogendeau, D., Klotz, C., Arnaiz, O., Malinowska, A., Dadlez, M., de Loubresse, N. G., Ruiz, F., Koll, F., and Beisson, J. (2008). Functional diversification of centrins and cell morphological complexity. *J Cell Sci* 121, 65-74.

Gong, F., Fahy, D., and Smerdon, M. J. (2006). Rad4-Rad23 interaction with SWI/SNF links ATP-dependent chromatin remodeling with nucleotide excision repair. *Nat Struct Mol Biol* 13, 902-907.

Groisman, R., Polanowska, J., Kuraoka, I., Sawada, J., Saijo, M., Drapkin, R., Kisselev, A. F., Tanaka, K., and Nakatani, Y. (2003). The ubiquitin ligase activity in the DDB2 and CSA complexes is differentially regulated by the COP9 signalosome in response to DNA damage. *Cell* 113, 357-367.

Guzder, S. N., Bailly, V., Sung, P., Prakash, L., and Prakash, S. (1995). Yeast DNA repair protein RAD23 promotes complex formation between transcription factor TFIIH and DNA damage recognition factor RAD14. *J Biol Chem* 270, 8385-8388.

Guzder, S. N., Sung, P., Prakash, L., and Prakash, S. (1996). Nucleotide excision repair in yeast is mediated by sequential assembly of repair factors and not by a pre-assembled repairosome. *J Biol Chem* 271, 8903-8910.

Guzder, S. N., Sung, P., Prakash, L., and Prakash, S. (1998). Affinity of yeast nucleotide excision repair factor 2, consisting of the Rad4 and Rad23 proteins, for ultraviolet damaged DNA. *J Biol Chem* 273, 31541-31546.

H

Hanawalt, P. C. (2001). Revisiting the rodent repairadox. *Environ Mol Mutagen* 38, 89-96.

Hanawalt, P. C. (2002). Subpathways of nucleotide excision repair and their regulation. *Oncogene* 21, 8949-8956.

Hartman, H., and Fedorov, A. (2002). The origin of the eukaryotic cell: a genomic investigation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 1420-1425.

- Hashiguchi, K., Matsumoto, Y., and Yasui, A. (2007). Recruitment of DNA repair synthesis machinery to sites of DNA damage/repair in living human cells. *Nucleic Acids Res* 35, 2913-2923.
- Henning, K. A., Li, L., Iyer, N., McDaniel, L. D., Reagan, M. S., Legerski, R., Schultz, R. A., Stefanini, M., Lehmann, A. R., Mayne, L. V., and Friedberg, E. C. (1995). The Cockayne syndrome group A gene encodes a WD repeat protein that interacts with CSB protein and a subunit of RNA polymerase II TFIIH. *Cell* 82, 555-564.
- Herrlich, P., Karin, M., and Weiss, C. (2008). Supreme EnLIGHTenment: damage recognition and signaling in the mammalian UV response. *Mol Cell* 29, 279-290.
- Hess, M. T., Schwitter, U., Petretta, M., Giese, B., and Naegeli, H. (1997). Bipartite substrate discrimination by human nucleotide excision repair. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 6664-6669.
- Hinchcliffe, E. H., and Sluder, G. (2001). "It takes two to tango": understanding how centrosome duplication is regulated throughout the cell cycle. *Genes Dev* 15, 1167-1181.
- Hoeijmakers, J. H. (2001). Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature* 411, 366-374.
- Hohl, M., Thorel, F., Clarkson, S. G., and Scharer, O. D. (2003). Structural determinants for substrate binding and catalysis by the structure-specific endonuclease XPG. *J Biol Chem* 278, 19500-19508.
- Hsieh, H. C., Hsieh, Y. H., Huang, Y. H., Shen, F. C., Tsai, H. N., Tsai, J. H., Lai, Y. T., Wang, Y. T., Chuang, W. J., and Huang, W. (2005). HHR23A, a human homolog of *Saccharomyces cerevisiae* Rad23, regulates xeroderma pigmentosum C protein and is required for nucleotide excision repair. *Biochem Biophys Res Commun* 335, 181-187.
- Hu, H., and Chazin, W. J. (2003). Unique features in the C-terminal domain provide caltractin with target specificity. *J Mol Biol* 330, 473-484.
- Huang, T. T., and D'Andrea, A. D. (2006). Regulation of DNA repair by ubiquitylation. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7, 323-334.
- Huen, M. S., and Chen, J. (2008). The DNA damage response pathways: at the crossroad of protein modifications. *Cell Res* 18, 8-16.
- Hut, H. M., Lemstra, W., Blaauw, E. H., Van Cappellen, G. W., Kampinga, H. H., and Sibon, O. C. (2003). Centrosomes split in the presence of impaired DNA integrity during mitosis. *Mol Biol Cell* 14, 1993-2004.
- Hwang, B. J., Ford, J. M., Hanawalt, P. C., and Chu, G. (1999). Expression of the p48 xeroderma pigmentosum gene is p53-dependent and is involved in global genomic repair. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 424-428.

I

- Ikehata, H., Kawai, K., Komura, J. I., Sakatsume, K., Wang, L., Imai, M., Higashi, S., Nikaido, O., Yamamoto, K., Hieda, K., *et al.* (2008). UVA1 Genotoxicity Is Mediated Not by Oxidative Damage but by Cyclobutane Pyrimidine Dimers in Normal Mouse Skin. *J Invest Dermatol* 128, 2289-2296.
- Iyer, N., Reagan, M. S., Wu, K. J., Canagarajah, B., and Friedberg, E. C. (1996). Interactions involving the human RNA polymerase II transcription/nucleotide excision repair complex TFIIH, the nucleotide excision repair protein XPG, and Cockayne syndrome group B (CSB) protein. *Biochemistry* 35, 2157-2167.

J

Jang, Y. J., Lin, C. Y., Ma, S., and Erikson, R. L. (2002). Functional studies on the role of the C-terminal domain of mammalian polo-like kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* *99*, 1984-1989.

Jansen, L. E., Verhage, R. A., and Brouwer, J. (1998). Preferential binding of yeast Rad4.Rad23 complex to damaged DNA. *J Biol Chem* *273*, 33111-33114.

Jaspersen, S. L., Giddings, T. H., Jr., and Winey, M. (2002). Mps3p is a novel component of the yeast spindle pole body that interacts with the yeast centrin homologue Cdc31p. *J Cell Biol* *159*, 945-956.

K

Kapetanaki, M. G., Guerrero-Santoro, J., Bisi, D. C., Hsieh, C. L., Ropic-Otrin, V., and Levine, A. S. (2006). The DDB1-CUL4ADDB2 ubiquitin ligase is deficient in xeroderma pigmentosum group E and targets histone H2A at UV-damaged DNA sites. *Proc Natl Acad Sci U S A* *103*, 2588-2593.

Katsumi, S., Kobayashi, N., Imoto, K., Nakagawa, A., Yamashina, Y., Muramatsu, T., Shirai, T., Miyagawa, S., Sugiura, S., Hanaoka, F., *et al.* (2001). In situ visualization of ultraviolet-light-induced DNA damage repair in locally irradiated human fibroblasts. *J Invest Dermatol* *117*, 1156-1161.

Kaur, M., Pop, M., Shi, D., Brignone, C., and Grossman, S. R. (2007). hHR23B is required for genotoxic-specific activation of p53 and apoptosis. *Oncogene* *26*, 1231-1237.

Keating, T. J., and Borisy, G. G. (2000). Immunostuctural evidence for the template mechanism of microtubule nucleation. *Nat Cell Biol* *2*, 352-357.

Keryer G., Rios RM., Landmark BF., Skalhegg B., Lohmann SM., Bornens M. (1993). A high-affinity binding protein for the regulatory subunit of cAMP-dependent protein kinase II in the centrosome of human cells. *Exp Cell Res* *204*,230-40.

Keryer, G., Witczak, O., Delouvee, A., Kemmner, W. A., Rouillard, D., Tasken, K., and Bornens, M. (2003). Dissociating the centrosomal matrix protein AKAP450 from centrioles impairs centriole duplication and cell cycle progression. *Mol Biol Cell* *14*, 2436-2446.

Khan, S. G., Metter, E. J., Tarone, R. E., Bohr, V. A., Grossman, L., Hedayati, M., Bale, S. J., Emmert, S., and Kraemer, K. H. (2000). A new xeroderma pigmentosum group C poly(AT) insertion/deletion polymorphism. *Carcinogenesis* *21*, 1821-1825.

Khan, S. G., Muniz-Medina, V., Shahnavi, T., Baker, C. C., Inui, H., Ueda, T., Emmert, S., Schneider, T. D., and Kraemer, K. H. (2002). The human XPC DNA repair gene: arrangement, splice site information content and influence of a single nucleotide polymorphism in a splice acceptor site on alternative splicing and function. *Nucleic Acids Res* *30*, 3624-3631.

Khodjakov, A., and Rieder, C. L. (2001). Centrosomes enhance the fidelity of cytokinesis in vertebrates and are required for cell cycle progression. *J Cell Biol* *153*, 237-242.

Kilmartin, J. V. (2003). Sfi1p has conserved centrin-binding sites and an essential function in budding yeast spindle pole body duplication. *J Cell Biol* *162*, 1211-1221.

Koblenz, B., Schoppmeier, J., Grunow, A., and Lechtreck, K. F. (2003). Centrin deficiency in *Chlamydomonas* causes defects in basal body replication, segregation and maturation. *J Cell Sci* *116*, 2635-2646.

Kramer, A., Mailand, N., Lukas, C., Syljuasen, R. G., Wilkinson, C. J., Nigg, E. A., Bartek, J., and Lukas, J. (2004). Centrosome-associated Chk1 prevents premature activation of cyclin-B-Cdk1 kinase. *Nat Cell Biol* 6, 884-891.

Kraemer, K. H., Patronas, N. J., Schiffmann, R., Brooks, B. P., Tamura, D., and DiGiovanna, J. J. (2007). Xeroderma pigmentosum, trichothiodystrophy and Cockayne syndrome: a complex genotype-phenotype relationship. *Neuroscience* 145, 1388-1396.

Kuluncsics, Z., Perdiz, D., Brulay, E., Muel, B., and Sage, E. (1999). Wavelength dependence of ultraviolet-induced DNA damage distribution: involvement of direct or indirect mechanisms and possible artefacts. *J Photochem Photobiol B* 49, 71-80.

Kyng, K. J., May, A., Brosh, R. M., Jr., Cheng, W. H., Chen, C., Becker, K. G., and Bohr, V. A. (2003). The transcriptional response after oxidative stress is defective in Cockayne syndrome group B cells. *Oncogene* 22, 1135-1149.

L

La Terra, S., English, C. N., Hergert, P., McEwen, B. F., Sluder, G., and Khodjakov, A. (2005). The de novo centriole assembly pathway in HeLa cells: cell cycle progression and centriole assembly/maturation. *J Cell Biol* 168, 713-722.

Lacey, K. R., Jackson, P. K., and Stearns, T. (1999). Cyclin-dependent kinase control of centrosome duplication. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 2817-2822.

Lan, L., Nakajima, S., Komatsu, K., Nussenzweig, A., Shimamoto, A., Oshima, J., and Yasui, A. (2005). Accumulation of Werner protein at DNA double-strand breaks in human cells. *J Cell Sci* 118, 4153-4162.

Lange, B. M. (2002). Integration of the centrosome in cell cycle control, stress response and signal transduction pathways. *Curr Opin Cell Biol* 14, 35-43.

Laoukili, J., Perret, E., Middendorp, S., Houcine, O., Guennou, C., Marano, F., Bornens, M., and Tournier, F. (2000). Differential expression and cellular distribution of centrin isoforms during human ciliated cell differentiation in vitro. *J Cell Sci* 113 (Pt 8), 1355-1364.

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 U S A* 72, 219-223.

Lehmann, A. R. (2003). DNA repair-deficient diseases, xeroderma pigmentosum, Cockayne syndrome and trichothiodystrophy. *Biochimie* 85, 1101-1111.

Lehmann, A. R., Niimi, A., Ogi, T., Brown, S., Sabbioneda, S., Wing, J. F., Kannouche, P. L., and Green, C. M. (2007). Translesion synthesis: Y-family polymerases and the polymerase switch. *DNA Repair (Amst)* 6, 891-899.

Li, L., Lu, X., Peterson, C. A., and Legerski, R. J. (1995). An interaction between the DNA repair factor XPA and replication protein A appears essential for nucleotide excision repair. *Mol Cell Biol* 15, 5396-5402.

Li, L., Lu, X., Peterson, C., and Legerski, R. (1997). XPC interacts with both HHR23B and HHR23A in vivo. *Mutat Res* 383, 197-203.

- Li, S., Sandercock, A. M., Conduit, P., Robinson, C. V., Williams, R. L., and Kilmartin, J. V. (2006). Structural role of Sfi1p-centrin filaments in budding yeast spindle pole body duplication. *J Cell Biol* 173, 867-877.
- Liang, L., Flury, S., Kalck, V., Hohn, B., and Molinier, J. (2006). CENTRIN2 interacts with the Arabidopsis homolog of the human XPC protein (AtRAD4) and contributes to efficient synthesis-dependent repair of bulky DNA lesions. *Plant Mol Biol* 61, 345-356.
- Lingle, W. L., Lutz, W. H., Ingle, J. N., Maihle, N. J., and Salisbury, J. L. (1998). Centrosome hypertrophy in human breast tumors: implications for genomic stability and cell polarity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 2950-2955.
- Lingle, W. L., Barrett, S. L., Negron, V. C., D'Assoro, A. B., Boeneman, K., Liu, W., Whitehead, C. M., Reynolds, C., and Salisbury, J. L. (2002). Centrosome amplification drives chromosomal instability in breast tumor development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 1978-1983.
- Lingle, W. L., and Salisbury, J. L. (1999). Altered centrosome structure is associated with abnormal mitoses in human breast tumors. *Am J Pathol* 155, 1941-1951.
- Liu, W., Nichols, A. F., Graham, J. A., Dualan, R., Abbas, A., and Linn, S. (2000). Nuclear transport of human DDB protein induced by ultraviolet light. *J Biol Chem* 275, 21429-21434.
- Livak, K. J., and Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25, 402-408.
- Loffler, H., Rebacz, B., Ho, A. D., Lukas, J., Bartek, J., and Kramer, A. (2006). Chk1-dependent regulation of Cdc25B functions to coordinate mitotic events. *Cell Cycle* 5, 2543-2547.
- Lommel, L., Chen, L., Madura, K., and Sweder, K. (2000). The 26S proteasome negatively regulates the level of overall genomic nucleotide excision repair. *Nucleic Acids Res* 28, 4839-4845.
- Lommel, L., Ortolan, T., Chen, L., Madura, K., and Sweder, K. S. (2002). Proteolysis of a nucleotide excision repair protein by the 26 S proteasome. *Curr Genet* 42, 9-20.
- Loncarek, J., Hergert, P., Magidson, V., and Khodjakov, A. (2008). Control of daughter centriole formation by the pericentriolar material. *Nat Cell Biol* 10, 322-328.
- Luijsterburg, M. S., Goedhart, J., Moser, J., Kool, H., Geverts, B., Houtsmuller, A. B., Mullenders, L. H., Vermeulen, W., and van Driel, R. (2007). Dynamic in vivo interaction of DDB2 E3 ubiquitin ligase with UV-damaged DNA is independent of damage-recognition protein XPC. *J Cell Sci* 120, 2706-2716.
- Lutz, W., Lingle, W. L., McCormick, D., Greenwood, T. M., and Salisbury, J. L. (2001). Phosphorylation of centrin during the cell cycle and its role in centriole separation preceding centrosome duplication. *J Biol Chem* 276, 20774-20780.

M

- Mahmoud, B. H., Hexsel, C. L., Hamzavi, I. H., and Lim, H. W. (2008). Effects of visible light on the skin. *Photochem Photobiol* 84, 450-462.
- Maillard, O., Solyom, S., and Naegeli, H. (2007). An aromatic sensor with aversion to damaged strands confers versatility to DNA repair. *PLoS Biol* 5, e79.

- Maldonado, E., Shiekhatar, R., Sheldon, M., Cho, H., Drapkin, R., Rickert, P., Lees, E., Anderson, C. W., Linn, S., and Reinberg, D. (1996). A human RNA polymerase II complex associated with SRB and DNA-repair proteins. *Nature* *381*, 86-89.
- Marti, T. M., Hefner, E., Feeney, L., Natale, V., and Cleaver, J. E. (2006). H2AX phosphorylation within the G1 phase after UV irradiation depends on nucleotide excision repair and not DNA double-strand breaks. *Proc Natl Acad Sci U S A* *103*, 9891-9896.
- Martinez-Sanz, J., Yang, A., Blouquit, Y., Duchambon, P., Assairi, L., and Craescu, C. T. (2006). Binding of human centrin 2 to the centrosomal protein hSfi1. *Febs J* *273*, 4504-4515.
- Masson, C., Menea, F., Pinon-Lataillade, G., Frobert, Y., Chevillard, S., Radicella, J. P., Sarasin, A., and Angulo, J. F. (2003). Global genome repair is required to activate KIN17, a UVC-responsive gene involved in DNA replication. *Proc Natl Acad Sci U S A* *100*, 616-621.
- Masutani, C., Sugasawa, K., Yanagisawa, J., Sonoyama, T., Ui, M., Enomoto, T., Takio, K., Tanaka, K., van der Spek, P. J., Bootsma, D., and et al. (1994). Purification and cloning of a nucleotide excision repair complex involving the xeroderma pigmentosum group C protein and a human homologue of yeast RAD23. *Embo J* *13*, 1831-1843.
- Masutani, C., Araki, M., Sugasawa, K., van der Spek, P. J., Yamada, A., Uchida, A., Maekawa, T., Bootsma, D., Hoeijmakers, J. H., and Hanaoka, F. (1997). Identification and characterization of XPC-binding domain of hHR23B. *Mol Cell Biol* *17*, 6915-6923.
- Masutani, C., Kusumoto, R., Iwai, S., and Hanaoka, F. (2000). Mechanisms of accurate translesion synthesis by human DNA polymerase eta. *Embo J* *19*, 3100-3109.
- Matei, E., Miron, S., Blouquit, Y., Duchambon, P., Durussel, I., Cox, J. A., and Craescu, C. T. (2003). C-terminal half of human centrin 2 behaves like a regulatory EF-hand domain. *Biochemistry* *42*, 1439-1450.
- Matsumoto, Y., Hayashi, K., and Nishida, E. (1999). Cyclin-dependent kinase 2 (Cdk2) is required for centrosome duplication in mammalian cells. *Curr Biol* *9*, 429-432.
- Matsumoto, Y., and Maller, J. L. (2004). A centrosomal localization signal in cyclin E required for Cdk2-independent S phase entry. *Science* *306*, 885-888.
- McHugh, P. J., Spanswick, V. J., and Hartley, J. A. (2001). Repair of DNA interstrand crosslinks: molecular mechanisms and clinical relevance. *Lancet Oncol* *2*, 483-490.
- McKay, B. C., Becerril, C., and Ljungman, M. (2001). P53 plays a protective role against UV- and cisplatin-induced apoptosis in transcription-coupled repair proficient fibroblasts. *Oncogene* *20*, 6805-6808.
- Melis, J. P., Wijnhoven, S. W., Beems, R. B., Roodbergen, M., van den Berg, J., Moon, H., Friedberg, E., van der Horst, G. T., Hoeijmakers, J. H., Vijg, J., and van Steeg, H. (2008). Mouse models for xeroderma pigmentosum group A and group C show divergent cancer phenotypes. *Cancer Res* *68*, 1347-1353.
- Meraldi, P., Lukas, J., Fry, A. M., Bartek, J., and Nigg, E. A. (1999). Centrosome duplication in mammalian somatic cells requires E2F and Cdk2-cyclin A. *Nat Cell Biol* *1*, 88-93.
- Middendorp, S., Paoletti, A., Schiebel, E., and Bornens, M. (1997). Identification of a new mammalian centrin gene, more closely related to *Saccharomyces cerevisiae* CDC31 gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* *94*, 9141-9146.

Middendorp, S., Kuntziger, T., Abraham, Y., Holmes, S., Bordes, N., Paintrand, M., Paoletti, A., and Bornens, M. (2000). A role for centrin 3 in centrosome reproduction. *J Cell Biol* 148, 405-416.

Mikule, K., Delaval, B., Kaldis, P., Jurczyk, A., Hergert, P., and Doxsey, S. (2007). Loss of centrosome integrity induces p38-p53-p21-dependent G1-S arrest. *Nat Cell Biol* 9, 160-170.

Missura, M., Buterin, T., Hindges, R., Hubscher, U., Kasparikova, J., Brabec, V., and Naegeli, H. (2001). Double-check probing of DNA bending and unwinding by XPA-RPA: an architectural function in DNA repair. *Embo J* 20, 3554-3564.

Molinier, J., Ramos, C., Fritsch, O., and Hohn, B. (2004). CENTRIN2 modulates homologous recombination and nucleotide excision repair in Arabidopsis. *Plant Cell* 16, 1633-1643.

Muotri, A. R., Bottero, V., Tergaonkar, V., and Correa, R. G. (2006). UV-mediated NF-kappaB activation is abolished in deficient XPC/D primary fibroblasts. *Cell Cycle* 5, 1085-1089.

Mussman, J. G., Horn, H. F., Carroll, P. E., Okuda, M., Tarapore, P., Donehower, L. A., and Fukasawa, K. (2000). Synergistic induction of centrosome hyperamplification by loss of p53 and cyclin E overexpression. *Oncogene* 19, 1635-1646.

N

Ng, J. M., Vrieling, H., Sugawara, K., Ooms, M. P., Grootegoed, J. A., Vreeburg, J. T., Visser, P., Beems, R. B., Gorgels, T. G., Hanaoka, F., *et al.* (2002). Developmental defects and male sterility in mice lacking the ubiquitin-like DNA repair gene mHR23B. *Mol Cell Biol* 22, 1233-1245.

Ng, J. M., Vermeulen, W., van der Horst, G. T., Bergink, S., Sugawara, K., Vrieling, H., and Hoeijmakers, J. H. (2003). A novel regulation mechanism of DNA repair by damage-induced and RAD23-dependent stabilization of xeroderma pigmentosum group C protein. *Genes Dev* 17, 1630-1645.

Nigg, E. A. (2002). Centrosome aberrations: cause or consequence of cancer progression? *Nat Rev Cancer* 2, 815-825.

Nishi, R., Okuda, Y., Watanabe, E., Mori, T., Iwai, S., Masutani, C., Sugawara, K., and Hanaoka, F. (2005). Centrin 2 stimulates nucleotide excision repair by interacting with xeroderma pigmentosum group C protein. *Mol Cell Biol* 25, 5664-5674.

Nishimura, T., Takahashi, M., Kim, H. S., Mukai, H., and Ono, Y. (2005). Centrosome-targeting region of CG-NAP causes centrosome amplification by recruiting cyclin E-cdk2 complex. *Genes Cells* 10, 75-86.

O

Okuda, M. (2002). The role of nucleophosmin in centrosome duplication. *Oncogene* 21, 6170-6174.

Okuda, Y., Nishi, R., Ng, J. M., Vermeulen, W., van der Horst, G. T., Mori, T., Hoeijmakers, J. H., Hanaoka, F., and Sugawara, K. (2004). Relative levels of the two mammalian Rad23 homologs determine composition and stability of the xeroderma pigmentosum group C protein complex. *DNA Repair (Amst)* 3, 1285-1295.

Orjalo, A. V., Arnautov, A., Shen, Z., Boyarchuk, Y., Zeitlin, S. G., Fontoura, B., Briggs, S., Dasso, M., and Forbes, D. J. (2006). The Nup107-160 nucleoporin complex is required for correct bipolar spindle assembly. *Mol Biol Cell* 17, 3806-3818.

Ortolan, T. G., Chen, L., Tongaonkar, P., and Madura, K. (2004). Rad23 stabilizes Rad4 from degradation by the Ub/proteasome pathway. *Nucleic Acids Res* 32, 6490-6500.

P

Paoletti, A., Moudjou, M., Paintrand, M., Salisbury, J. L., and Bornens, M. (1996). Most of centrin in animal cells is not centrosome-associated and centrosomal centrin is confined to the distal lumen of centrioles. *J Cell Sci* 109 (Pt 13), 3089-3102.

Perucca, P., Cazzalini, O., Mortusewicz, O., Necchi, D., Savio, M., Nardo, T., Stivala, L. A., Leonhardt, H., Cardoso, M. C., and Prosperi, E. (2006). Spatiotemporal dynamics of p21CDKN1A protein recruitment to DNA-damage sites and interaction with proliferating cell nuclear antigen. *J Cell Sci* 119, 1517-1527.

Pfeifer, G. P., You, Y. H., and Besaratinia, A. (2005). Mutations induced by ultraviolet light. *Mutat Res* 571, 19-31.

Piel, M., Nordberg, J., Euteneuer, U., and Bornens, M. (2001). Centrosome-dependent exit of cytokinesis in animal cells. *Science* 291, 1550-1553.

Pihan, G. A., Wallace, J., Zhou, Y., and Doxsey, S. J. (2003). Centrosome abnormalities and chromosome instability occur together in pre-invasive carcinomas. *Cancer Res* 63, 1398-1404.

Pommier, Y., Redon, C., Rao, V. A., Seiler, J. A., Sordet, O., Takemura, H., Antony, S., Meng, L., Liao, Z., Kohlhagen, G., *et al.* (2003). Repair of and checkpoint response to topoisomerase I-mediated DNA damage. *Mutat Res* 532, 173-203.

Popescu, A., Miron, S., Blouquit, Y., Duchambon, P., Christova, P., and Craescu, C. T. (2003). Xeroderma pigmentosum group C protein possesses a high affinity binding site to human centrin 2 and calmodulin. *J Biol Chem* 278, 40252-40261.

Proietti-De-Santis, L., Drane, P., and Egly, J. M. (2006). Cockayne syndrome B protein regulates the transcriptional program after UV irradiation. *Embo J* 25, 1915-1923.

Q

Quintyne, N. J., Reing, J. E., Hoffelder, D. R., Gollin, S. M., and Saunders, W. S. (2005). Spindle multipolarity is prevented by centrosomal clustering. *Science* 307, 127-129.

R

Rademakers, S., Volker, M., Hoogstraten, D., Nigg, A. L., Mone, M. J., Van Zeeland, A. A., Hoeijmakers, J. H., Houtsmuller, A. B., and Vermeulen, W. (2003). Xeroderma pigmentosum group A protein loads as a separate factor onto DNA lesions. *Mol Cell Biol* 23, 5755-5767.

Ramsey, K. L., Smith, J. J., Dasgupta, A., Maqani, N., Grant, P., and Auble, D. T. (2004). The NEF4 complex regulates Rad4 levels and utilizes Snf2/Swi2-related ATPase activity for nucleotide excision repair. *Mol Cell Biol* 24, 6362-6378.

Rapic-Otrin, V., Navazza, V., Nardo, T., Botta, E., McLenigan, M., Bisi, D. C., Levine, A. S., and Stefanini, M. (2003). True XP group E patients have a defective UV-damaged DNA binding protein complex and mutations in DDB2 which reveal the functional domains of its p48 product. *Hum Mol Genet* 12, 1507-1522.

Reed, S. I. (2003). Ratchets and clocks: the cell cycle, ubiquitylation and protein turnover. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4, 855-864.

Resendes, K. K., Rasala, B. A., and Forbes, D. J. (2008). Centrin 2 localizes to the vertebrate nuclear pore and plays a role in mRNA and protein export. *Mol Cell Biol* 28, 1755-1769.

Rice, L. M., and Agard, D. A. (2002). Centriole duplication: centrin in on answers? *Curr Biol* 12, R618-619.

Rich, T., Allen, R. L., and Wyllie, A. H. (2000). Defying death after DNA damage. *Nature* 407, 777-783.

Riedl, T., Hanaoka, F., and Egly, J. M. (2003). The comings and goings of nucleotide excision repair factors on damaged DNA. *Embo J* 22, 5293-5303.

Rivera-Begeman, A., McDaniel, L. D., Schultz, R. A., and Friedberg, E. C. (2007). A novel XPC pathogenic variant detected in archival material from a patient diagnosed with Xeroderma Pigmentosum: a case report and review of the genetic variants reported in XPC. *DNA Repair (Amst)* 6, 100-114.

Roderick, H. L., and Cook, S. J. (2008). calcium signalling checkpoints in cancer: remodelling calcium for cancer cell proliferation and survival. *Nat Rev Cancer* 8, 361-375.

Ruiz, F., Garreau de Loubresse, N., Klotz, C., Beisson, J., and Koll, F. (2005). Centrin deficiency in *Paramecium* affects the geometry of basal-body duplication. *Curr Biol* 15, 2097-2106.

S

Salisbury, J. L., Suino, K. M., Busby, R., and Springett, M. (2002). Centrin-2 is required for centriole duplication in mammalian cells. *Curr Biol* 12, 1287-1292.

Salisbury, J. L. (2007). A mechanistic view on the evolutionary origin for centrin-based control of centriole duplication. *J Cell Physiol* 213, 413-428.

Salisbury, J. L. (2008). Breaking the ties that bind centriole numbers. *Nat Cell Biol* 10, 255-257.

Sankaran, S., Crone, D. E., Palazzo, R. E., and Parvin, J. D. (2007). BRCA1 regulates gamma-tubulin binding to centrosomes. *Cancer Biol Ther* 6, 1853-1857.

Sanyal, S., Festa, F., Sakano, S., Zhang, Z., Steineck, G., Norming, U., Wijkstrom, H., Larsson, P., Kumar, R., and Hemminki, K. (2004). Polymorphisms in DNA repair and metabolic genes in bladder cancer. *Carcinogenesis* 25, 729-734.

Sarasin, A. (2003). An overview of the mechanisms of mutagenesis and carcinogenesis. *Mutat Res* 544, 99-106.

Schatten, H., Wiedemeier, A. M., Taylor, M., Lubahn, D. B., Greenberg, N. M., Besch-Williford, C., Rosenfeld, C. S., Day, J. K., and Ripple, M. (2000). Centrosome-centriole abnormalities are markers for abnormal cell divisions and cancer in the transgenic adenocarcinoma mouse prostate (TRAMP) model. *Biol Cell* 92, 331-340.

Schauber, C., Chen, L., Tongaonkar, P., Vega, I., Lambertson, D., Potts, W., and Madura, K. (1998). Rad23 links DNA repair to the ubiquitin/proteasome pathway. *Nature* 391, 715-718.

Selvapandiyani, A., Debrabant, A., Duncan, R., Muller, J., Salotra, P., Sreenivas, G., Salisbury, J. L., and Nakhasi, H. L. (2004). Centrin gene disruption impairs stage-specific basal body duplication and cell cycle progression in *Leishmania*. *J Biol Chem* 279, 25703-25710.

Shimizu, Y., Iwai, S., Hanaoka, F., and Sugawara, K. (2003). Xeroderma pigmentosum group C protein interacts physically and functionally with thymine DNA glycosylase. *Embo J* 22, 164-173.

Shivji, M. K., Podust, V. N., Hubscher, U., and Wood, R. D. (1995). Nucleotide excision repair DNA synthesis by DNA polymerase epsilon in the presence of PCNA, RFC, and RPA. *Biochemistry* 34, 5011-5017.

Shuck, S. C., Short, E. A., and Turchi, J. J. (2008). Eukaryotic nucleotide excision repair: from understanding mechanisms to influencing biology. *Cell Res* 18, 64-72.

Sibon, O. C., Kelkar, A., Lemstra, W., and Theurkauf, W. E. (2000). DNA-replication/DNA-damage-dependent centrosome inactivation in *Drosophila* embryos. *Nat Cell Biol* 2, 90-95.

Sluder, G. and Nordberg, J. J. (2004). The good, the bad and the ugly: the practical consequences of centrosome amplification. *Curr Opin Cell Biol* 16, 49-54.

Spang, A., Courtney, I., Fackler, U., Matzner, M., and Schiebel, E. (1993). The calcium-binding protein cell division cycle 31 of *Saccharomyces cerevisiae* is a component of the half bridge of the spindle pole body. *J Cell Biol* 123, 405-416.

States, J. C., McDuffie, E. R., Myrand, S. P., McDowell, M., and Cleaver, J. E. (1998). Distribution of mutations in the human xeroderma pigmentosum group A gene and their relationships to the functional regions of the DNA damage recognition protein. *Hum Mutat* 12, 103-113.

Sugawara, K., Masutani, C., Uchida, A., Maekawa, T., van der Spek, P. J., Bootsma, D., Hoeijmakers, J. H., and Hanaoka, F. (1996). HHR23B, a human Rad23 homolog, stimulates XPC protein in nucleotide excision repair in vitro. *Mol Cell Biol* 16, 4852-4861.

Sugawara, K., Ng, J. M., Masutani, C., Maekawa, T., Uchida, A., van der Spek, P. J., Eker, A. P., Rademakers, S., Visser, C., Aboussekhra, A., *et al.* (1997). Two human homologs of Rad23 are functionally interchangeable in complex formation and stimulation of XPC repair activity. *Mol Cell Biol* 17, 6924-6931.

Sugawara, K., Okamoto, T., Shimizu, Y., Masutani, C., Iwai, S., and Hanaoka, F. (2001). A multistep damage recognition mechanism for global genomic nucleotide excision repair. *Genes Dev* 15, 507-521.

Sugawara, K., Okuda, Y., Saijo, M., Nishi, R., Matsuda, N., Chu, G., Mori, T., Iwai, S., Tanaka, K., and Hanaoka, F. (2005). UV-induced ubiquitylation of XPC protein mediated by UV-DDB-ubiquitin ligase complex. *Cell* 121, 387-400.

Sugawara, K. (2008). Xeroderma pigmentosum genes: functions inside and outside DNA repair. *Carcinogenesis* 29, 455-465.

Sullivan, D. S., Biggins, S., and Rose, M. D. (1998). The yeast centrin, cdc31p, and the interacting protein kinase, Kic1p, are required for cell integrity. *J Cell Biol* 143, 751-765.

T

Takada, S., Kelkar, A., and Theurkauf, W. E. (2003). *Drosophila* checkpoint kinase 2 couples centrosome function and spindle assembly to genomic integrity. *Cell* 113, 87-99.

Takahashi, M., Shibata, H., Shimakawa, M., Miyamoto, M., Mukai, H., and Ono, Y. (1999). Characterization of a novel giant scaffolding protein, CG-NAP, that anchors multiple signaling enzymes to centrosome and the golgi apparatus. *J Biol Chem* 274, 17267-17274.

Takahashi, M., Yamagiwa, A., Nishimura, T., Mukai, H., and Ono, Y. (2002). Centrosomal proteins CG-NAP and kendrin provide microtubule nucleation sites by anchoring gamma-tubulin ring complex. *Mol Biol Cell* 13, 3235-3245.

Tapias, A., Auriol, J., Forget, D., Enzlin, J. H., Scharer, O. D., Coin, F., Coulombe, B., and Egly, J. M. (2004). Ordered conformational changes in damaged DNA induced by nucleotide excision repair factors. *J Biol Chem* 279, 19074-19083.

Thoma, B. S., and Vasquez, K. M. (2003). Critical DNA damage recognition functions of XPC-hHR23B and XPA-RPA in nucleotide excision repair. *Mol Carcinog* 38, 1-13.

Thoma, B. S., Wakasugi, M., Christensen, J., Reddy, M. C., and Vasquez, K. M. (2005). Human XPC-hHR23B interacts with XPA-RPA in the recognition of triplex-directed psoralen DNA interstrand crosslinks. *Nucleic Acids Res* 33, 2993-3001.

Thompson, J. R., Ryan, Z. C., Salisbury, J. L., and Kumar, R. (2006). The structure of the human centrin 2-xeroderma pigmentosum group C protein complex. *J Biol Chem* 281, 18746-18752.

Tissier, A., McDonald, J. P., Frank, E. G., and Woodgate, R. (2000). poliota, a remarkably error-prone human DNA polymerase. *Genes Dev* 14, 1642-1650.

Tourbez, M., Firanescu, C., Yang, A., Unipan, L., Duchambon, P., Blouquit, Y., and Craescu, C. T. (2004). calcium-dependent self-assembly of human centrin 2. *J Biol Chem* 279, 47672-47680.

Tutt, A., Gabriel, A., Bertwistle, D., Connor, F., Paterson, H., Peacock, J., Ross, G., and Ashworth, A. (1999). Absence of Brca2 causes genome instability by chromosome breakage and loss associated with centrosome amplification. *Curr Biol* 9, 1107-1110.

U

Uchida, A., Sugasawa, K., Masutani, C., Dohmae, N., Araki, M., Yokoi, M., Ohkuma, Y., and Hanaoka, F. (2002). The carboxy-terminal domain of the XPC protein plays a crucial role in nucleotide excision repair through interactions with transcription factor IIIH. *DNA Repair (Amst)* 1, 449-461.

V

Vallen, E. A., Ho, W., Winey, M., and Rose, M. D. (1994). Genetic interactions between CDC31 and KAR1, two genes required for duplication of the microtubule organizing center in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 137, 407-422.

van der Spek, P. J., Eker, A., Rademakers, S., Visser, C., Sugasawa, K., Masutani, C., Hanaoka, F., Bootsma, D., and Hoeijmakers, J. H. (1996). XPC and human homologs of RAD23: intracellular localization and relationship to other nucleotide excision repair complexes. *Nucleic Acids Res* 24, 2551-2559.

Viprakasit, V., Gibbons, R. J., Broughton, B. C., Tolmie, J. L., Brown, D., Lunt, P., Winter, R. M., Marinoni, S., Stefanini, M., Brueton, L., *et al.* (2001). Mutations in the general transcription factor TFIIH result in beta-thalassaemia in individuals with trichothiodystrophy. *Hum Mol Genet* 10, 2797-2802.

Volker, M., Mone, M. J., Karmakar, P., van Hoffen, A., Schul, W., Vermeulen, W., Hoeijmakers, J. H., van Driel, R., van Zeeland, A. A., and Mullenders, L. H. (2001). Sequential assembly of the nucleotide excision repair factors in vivo. *Mol Cell* 8, 213-224.

W

Wakasugi, M., Reardon, J. T., and Sancar, A. (1997). The non-catalytic function of XPG protein during dual incision in human nucleotide excision repair. *J Biol Chem* 272, 16030-16034.

Wakasugi, M., and Sancar, A. (1999). Order of assembly of human DNA repair excision nuclease. *J Biol Chem* 274, 18759-18768.

Wang, Q. E., Zhu, Q., Wani, M. A., Wani, G., Chen, J., and Wani, A. A. (2003). Tumor suppressor p53 dependent recruitment of nucleotide excision repair factors XPC and TFIIH to DNA damage. *DNA Repair (Amst)* 2, 483-499.

Wang, G., Chuang, L., Zhang, X., Colton, S., Dombkowski, A., Reiners, J., Diakiw, A., and Xu, X. S. (2004a). The initiative role of XPC protein in cisplatin DNA damaging treatment-mediated cell cycle regulation. *Nucleic Acids Res* 32, 2231-2240.

Wang, Q. E., Zhu, Q., Wani, G., Chen, J., and Wani, A. A. (2004b). UV radiation-induced XPC translocation within chromatin is mediated by damaged-DNA binding protein, DDB2. *Carcinogenesis* 25, 1033-1043.

Wang, Q. E., Zhu, Q., Wani, G., El-Mahdy, M. A., Li, J., and Wani, A. A. (2005). DNA repair factor XPC is modified by SUMO-1 and ubiquitin following UV irradiation. *Nucleic Acids Res* 33, 4023-4034.

Wang, H., Zhai, L., Xu, J., Joo, H. Y., Jackson, S., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Xiong, Y., and Zhang, Y. (2006). Histone H3 and H4 ubiquitylation by the CUL4-DDB-ROC1 ubiquitin ligase facilitates cellular response to DNA damage. *Mol Cell* 22, 383-394.

Wang, Q. E., Praetorius-Ibba, M., Zhu, Q., El-Mahdy, M. A., Wani, G., Zhao, Q., Qin, S., Patnaik, S., and Wani, A. A. (2007). Ubiquitylation-independent degradation of Xeroderma pigmentosum group C protein is required for efficient nucleotide excision repair. *Nucleic Acids Res* 35, 5338-5350.

Wigley, W. C., Fabunmi, R. P., Lee, M. G., Marino, C. R., Muallem, S., DeMartino, G. N., and Thomas, P. J. (1999). Dynamic association of proteasomal machinery with the centrosome. *J Cell Biol* 145, 481-490.

Witczak, O., Skalhegg, B. S., Keryer, G., Bornens, M., Tasken, K., Jahnsen, T., and Orstavik, S. (1999). Cloning and characterization of a cDNA encoding an A-kinase anchoring protein located in the centrosome, AKAP450. *Embo J* 18, 1858-1868.

Wittschieben, B. O., Iwai, S., and Wood, R. D. (2005). DDB1-DDB2 (xeroderma pigmentosum group E) protein complex recognizes a cyclobutane pyrimidine dimer, mismatches, apurinic/apyrimidinic sites, and compound lesions in DNA. *J Biol Chem* 280, 39982-39989.

Woudstra, E. C., Gilbert, C., Fellows, J., Jansen, L., Brouwer, J., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., and Svejstrup, J. Q. (2002). A Rad26-Def1 complex coordinates repair and RNA pol II proteolysis in response to DNA damage. *Nature* 415, 929-933.

Wu, Y. H., Tsai Chang, J. H., Cheng, Y. W., Wu, T. C., Chen, C. Y., and Lee, H. (2007). Xeroderma pigmentosum group C gene expression is predominantly regulated by promoter hypermethylation and contributes to p53 mutation in lung cancers. *Oncogene* 26, 4761-4773.

X

Xie, Z., Liu, S., Zhang, Y., and Wang, Z. (2004). Roles of Rad23 protein in yeast nucleotide excision repair. *Nucleic Acids Res* 32, 5981-5990.

Xu, X., Weaver, Z., Linke, S. P., Li, C., Gotay, J., Wang, X. W., Harris, C. C., Ried, T., and Deng, C. X. (1999). Centrosome amplification and a defective G2-M cell cycle checkpoint induce genetic instability in BRCA1 exon 11 isoform-deficient cells. *Mol Cell* 3, 389-395.

Y

Yang, A., Miron, S., Duchambon, P., Assairi, L., Blouquit, Y., and Craescu, C. T. (2006a). The N-terminal domain of human centrin 2 has a closed structure, binds calcium with a very low affinity, and plays a role in the protein self-assembly. *Biochemistry* 45, 880-889.

Yang, A., Miron, S., Mouawad, L., Duchambon, P., Blouquit, Y., and Craescu, C. T. (2006b). Flexibility and plasticity of human centrin 2 binding to the xeroderma pigmentosum group C protein (XPC) from nuclear excision repair. *Biochemistry* 45, 3653-3663.

Yasuda, G., Nishi, R., Watanabe, E., Mori, T., Iwai, S., Orioli, D., Stefanini, M., Hanaoka, F., and Sugawara, K. (2007). In vivo destabilization and functional defects of the xeroderma pigmentosum C protein caused by a pathogenic missense mutation. *Mol Cell Biol* 27, 6606-6614.

Yokoi, M., Masutani, C., Maekawa, T., Sugawara, K., Ohkuma, Y., and Hanaoka, F. (2000). The xeroderma pigmentosum group C protein complex XPC-HR23B plays an important role in the recruitment of transcription factor IIIH to damaged DNA. *J Biol Chem* 275, 9870-9875.

You, J. S., Wang, M., and Lee, S. H. (2003). Biochemical analysis of the damage recognition process in nucleotide excision repair. *J Biol Chem* 278, 7476-7485.

Z

Zhang, W., Fletcher, L., and Muschel, R. J. (2005). The role of Polo-like kinase 1 in the inhibition of centrosome separation after ionizing radiation. *J Biol Chem* 280, 42994-42999.