

ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE

Laboratoire Biotechnologie et signalisation cellulaire, UMR 7242 du CNRS, Strasbourg

THÈSE DE DOCTORAT

présentée par :

Thomas KALISCH

soutenue le : 26 septembre 2013

pour obtenir le grade de :

Docteur de l'université de Strasbourg

Discipline : Sciences du vivant

Spécialité : Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie

**Caractérisation fonctionnelle et biochimique d'un
nouveau partenaire de la Poly(ADP-ribose) Polymérase I :
High-Mobility Group protein containing 2-like 1**

THÈSE dirigée par le Dr Valérie SCHREIBER

RAPPORTEURS :

Pr Olga LAVRIK, Institute of chemical biology and fundamental medicine, Novosibirsk (Russia)
Dr Javier OLIVER, Institute of parasitology and biomedicine, Granada (Spain)

AUTRES MEMBRES DU JURY :

Pr Bruno CHATTON, Université de Strasbourg

Thomas KALISCH

Caractérisation biochimique et fonctionnelle d'un nouveau partenaire de la Poly(ADP-ribose) Polymérase I : High-Mobility Group containing protein 2-like 1.

Résumé

La poly(ADP-ribosyl)ation est une modification post-traductionnelle des protéines catalysée par une famille d'enzymes : les poly(ADP-ribose) polymérases. Parmi les plus étudiées, PARP-1 et PARP-2 interviennent dans l'organisation, l'expression et le maintien de l'intégrité du génome.

Nous avons initié l'étude d'un nouveau partenaire de PARP-1 préalablement identifié par double-hybride, et encore peu étudié à ce jour : HMG2L1 (High-Mobility Group protein 2 Like-1). La protéine humaine de 601 acides aminés contient un domaine HMG (High-Mobility Group) normalement impliqué dans l'interaction avec l'ADN. Quelques études ont montré que HMG2L1 régule la transcription en agissant comme co-régulateur négatif ou positif.

Dans un premier temps, nous avons caractérisé le lien entre PARP-1 et HMG2L1. L'interaction avec PARP-1 a été confirmée *in-vivo* et *in vitro*. Nous avons montré que HMG2L1 pouvait également interagir avec PARP-2. HMG2L1 est poly(ADP-ribosyl)ée par PARP-1 et PARP-2, de même qu'elle est capable d'interagir avec le poly(ADP-ribose). La construction de formes tronquées de HMG2L1 en fusion avec la GFP nous a permis de montrer que le domaine N-terminal – en amont du domaine HMG – est impliqué dans ces interactions. Ce domaine N-terminal est très électropositif et intrinsèquement désordonné ce qui lui confère de nombreuses potentialités d'interactions.

L'expression des fusions GFP dans des cellules HeLa nous a permis de montrer la localisation nucléaire et nucléolaire de HMG2L1, comme c'est le cas pour PARP-1 et PARP-2. En outre, HMG2L1 colocalise avec UBF (Upstream Binding Factor), le facteur de transcription de l'ARN polymérase I responsable de la transcription des ARN ribosomiaux. La surexpression de GFP-hHMG2L1 entraîne un stress nucléolaire caractérisé par l'inhibition de la transcription des ADNr et la formation de coiffes nucléolaires.

Nous avons également entrepris une recherche de partenaires de HMG2L1 par spectrométrie de masse. De nombreuses protéines nucléolaires, impliquées dans la biogenèse des ribosomes ou la maturation des ARNs ont été identifiées, suggérant un rôle de HMG2L1 dans ces processus. Nous avons montré que la protéine purifiée interagit avec l'ADN via son domaine HMG principalement, et qu'elle interagit avec l'ARN via son domaine N-terminal. Mais surtout, nous avons mis en évidence une activité ARN-chaperonne, qui peut être régulée par le poly(ADP-ribose).

La localisation de HMG2L1, son réseau d'interaction ainsi que son activité chaperonne nous laissent à penser qu'elle pourrait être impliquée dans des processus de maturation des ARN, régulés par la poly(ADP-ribosyl)ation.

Mots-clés

poly(ADP-ribosyl)ation, high-mobility group containing protein 2-like 1, nucléole, chaperonne à ARN, protéine intrinsèquement désordonnée, biogenèse des ribosomes

Thomas KALISCH

Biochemical and functional characterization of a new interactant partner of Poly(ADP-ribose) polymerase I : High-Mobility Group containing protein 2-like 1.

Abstract

Poly(ADP-ribosyl)ation is a post-translational modification of proteins mediated by a family of enzymes called poly(ADP-ribose) polymerases. Among the best studied, PARP-1 and PARP-2 are both implicated into the transcription, organization and integrity of genome.

We have initiated the characterization of a new PARP-1 partner previously identified in a yeast two-hybrid screen, and still poorly studied: HMG2L1 (High-Mobility Group protein 2 Like-1). The human protein of 601 amino acids contains one HMGbox domain normally implicated in the recognition of DNA. Some studies have reported the role of HMG2L1 in the regulation of transcription by acting as a negative or positive coregulator.

First, we characterized the link between PARP-1 and HMG2L1. We confirmed the interaction between both proteins in vivo and in vitro. We also showed that HMG2L1 could interact with PARP-2. HMG2L1 is poly(ADP-ribosyl)ated by PARP-1 and PARP-2, and is able to interact with poly(ADP-ribose). The construction of GFP-fused truncated versions of HMG2L1 allowed us to show that the N-terminal part – upstream to the HMGbox – is responsible for all these interactions. This N-terminal domain is highly electropositive and intrinsically disordered conferring a lot of interactions potentialities.

The expression of the GFP-fused proteins in HeLa cells allowed us to localize HMG2L1 into the nucleus and the nucleolus, like PARP-1 and PARP-2. Moreover, HMG2L1 colocalizes with UBF (Upstream Binding Factor), the transcription factor responsible for the transcription of ribosomal ARNs by RNA polymerase I. The overexpression of GFP-hHMG2L1 leads to a nucleolar stress illustrated by the inhibition of transcription and the formation of nucleolar caps.

We also undertook a proteomic study to find new partners of HMG2L1. We found a huge amount of nucleolar proteins, involved in ribosome biogenesis or RNA maturation, suggesting that HMG2L1 could be involved in these processes. Finally, we demonstrated the ability of the purified protein to interact with DNA mostly through its HMGbox domain and RNA through its N-terminal domain. Moreover, we discovered that HMG2L1 is endowed with a RNA-chaperone activity, that can be regulated by poly(ADP-ribose).

Taken together, the localization of HMG2L1, its interacting partners and its RNA-chaperone activity allow us to make the assumption that HMG2L1 could be implicated in RNA maturation processes, regulated by poly(ADP-ribosyl)ation.

Key-words

poly(ADP-ribosyl)ation, high-mobility group containing protein 2-like 1, nucleolus, RNA chaperon protein, intrinsically disordered protein, biogenesis of ribosomes



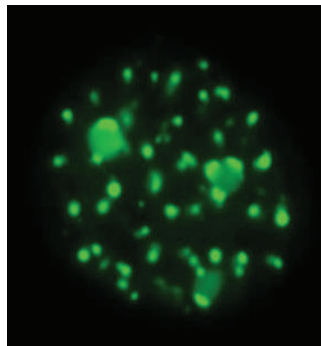
Thèse présentée pour obtenir le grade de
Docteur de l'Université de Strasbourg

Discipline : Sciences de la Vie
Spécialité : Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie

Par Thomas KALISCH

**Caractérisation biochimique et fonctionnelle d'un nouveau
partenaire de la Poly(ADP-ribose) Polymérase-1 :
High-mobility group protein 2-like 1 (HMG2L1)**

Thèse soutenue publiquement le 26 septembre 2013



Membres du jury :

Rapporteur externe : Pr Olga LAVRIK

Rapporteur externe : Dr Javier OLIVER

Examineur interne : Pr Bruno CHATTON

Directeur de thèse : Dr Valérie SCHREIBER

Equipe « Poly(ADP-ribosyl)ation et intégrité du génome
UMR7242 – BSC – CNRS
Bd Sébastien Brant – BP10413 – 67412 ILLKIRCH Cedex

Remerciements

Beaucoup de personnes s'imaginent encore aujourd'hui le chercheur barbu seul dans son laboratoire avec un tube à essai à la main. Ce paragraphe de remerciements leur permettra de comprendre que la recherche est avant tout le fruit d'un travail d'équipe et souvent même de collaborations avec d'autres chercheurs plus lointains. Il y a bien évidemment de nombreuses personnes à remercier, parce qu'elles ont permis ou accompagné ce projet de thèse. J'espère ne pas en oublier.

Je commence bien évidemment par toi, Valérie. Cela doit faire quand même plus de cinq années que j'ai rencontré la PARP, grâce à un cours que tu nous as dispensé à l'époque en M1. Je t'ai déjà entendue dire que donner un cours n'est pas forcément facile pour toi, et bien je peux te rassurer car ce jour là, tu as su allier pédagogie et passion pour me donner envie de la recherche. Je ne sais pas si je te l'ai confié, mais déjà à l'époque j'hésitais entre recherche et enseignement. Après ce cours, pour moi c'était clair, ce serait cette équipe et cette thématique de recherche pour une potentielle thèse ou sinon rien. Je n'ai donc envoyé qu'un seul email dans le but de faire un stage et il était pour toi. Alors, forcément je te remercie de m'avoir donné ma chance et de m'avoir accompagné jusqu'ici. Néanmoins, cela n'a pas toujours été facile, entre le projet qui n'a pas toujours donné ce qu'on attendait, mes cours à l'université pour lesquels tu m'as toujours soutenu (merci pour cela aussi d'ailleurs) et ma famille que tu as vu grandir durant ces 4 ans, franchement tu as été patiente ! Justement, je finirai là-dessus, je pense que ta patience a été assez largement éprouvée ces dernières années et que tu as aussi le droit maintenant à des projets qui cartonnent et sur lesquels tu n'as pas à te tirer constamment les cheveux ! En tout cas, je te le souhaite et tu le mérites, scientifiquement et humainement ! J'espère que ce sera avec ta prochaine doctorante, Eléa, qui est là un tout petit peu grâce aux TP/TD que tu m'as laissé encadrer pendant trois années à l'université "puis" à ce stage que tu lui as permis de réaliser il y a quelques années dans notre équipe, cette anecdote me laisse à penser que, souvent dans la vie, les événements n'arrivent pas totalement par hasard ! Tu vois, même dans les remerciements, je ne peux m'empêcher de construire des phrases alambiquées.

Françoise, merci à toi pour ces années, les discussions lors des lab-meetings et les idées que tu as su nous donner alors que nous étions dans le flou. Sincèrement, cette équipe PARP, c'est toi et Valérie ou Valérie et toi, c'est égal, vous êtes toutes deux d'un très haut niveau scientifique.

Avec vous deux, les PARPs sont entre de bonnes mains ! Si j'osais une théorie à la Jean-Christophe (alias J-C), vous seriez en fait des PARPs personnifiées. Vous synthétiseriez une sorte de polymère permettant de structurer l'équipe pour lui donner alors cette unité que nous ne voyons que très rarement, les autres membres de l'équipe peuvent en témoigner. Mais attention, vous êtes aussi de bonnes gardiennes de l'intégrité de l'équipe, c'est d'ailleurs certainement pour cela que l'unité est si forte. Sinon, Valérie, tu recrutes formidablement bien aussi, la preuve ce cours où tu as su me rapprocher de la PARP ! Je pense qu'il y a quelque chose de vrai dans cette théorie quand même !

Qu'en penses-tu J-C ? Je t'ai peut-être piqué l'idée en fait. En général, c'est dans ton esprit fécond que naissent toutes les idées géniales ou parfois farfelues aussi... Bref, en tout cas c'est grâce à toi (ou à cause, c'est selon) que je suis entrain d'écrire ces remerciements sur un mac ! Je ne saurais jamais si tu as des actions Apple, mais pour que tu leur fasses autant de publicité tu dois forcément y gagner quelque chose ! Merci à toi, pour tes conseils techniques précieux et tes bonnes idées (la chaperonne, c'était toi en premier, du coup je rends à J-C ce qui appartient à J-C !) mais aussi pour nos discussions. J'ai tout de même deux regrets : ne pas avoir pu te piquer ta « magic-touch » pour faire avancer le projet plus vite et surtout ne pas avoir pu chanter la Marseillaise devant ta cheminée ;) !

Aurélia, ma collègue de laboratoire et mon compagnon d'infortunes... Toi sur PARP-9, moi sur HMG2L1. Qu'est-ce qu'on a pu se lamenter sur le mur nous séparant du laboratoire d'à côté où tout va comme sur des roulettes et où les hypothèses sont si souvent confirmées. Du coup, nous nous sommes soutenus et nous avons même fini par nous trouver une passion commune peu glorieuse : les potins. Bon, cela n'a pas trop fonctionné et du coup nous ne pourrons pas nous recycler en créant un magazine people... Mais il te reste toujours le Grand Frais, en ce qui me concerne ce sera Starlab... ;) Je te souhaite une belle fin de construction et un bon nouveau voisin ou voisine de paillasse !

Najat, je garderai à jamais la trace de ton timer dans mon dos. Bon, je te le concède, je l'ai bien cherché ! Du coup j'en ai oublié ton âge ! Sinon, un conseil : n'embête pas trop les gens du labo en tant que nouvelle ACMO, en tout cas moi je suis tranquille ! Et bien sûr, je ne pouvais pas t'écrire ces quelques mots sans te remercier pour ta bonne humeur et ton fameux thé à la menthe. Lui aussi va me manquer (avec les gâteaux choco/coco d'Aurélia ;))

Passons maintenant aux compagnons doctorants ou amis PQ comme dirait Christian. Je vais faire cela du plus ancien au plus récent !

Delphine et Tonie, merci à vous de m'avoir accueilli, encadré et intégré dans l'équipe lorsque je suis arrivé en 2008. Merci à vous pour les discussions partagées et les conseils que vous m'avez prodigués. Désolé Tonie, mais non je ne pouvais vraiment pas prendre ta suite dans le projet PARP-9. C'était trop risqué... du coup j'ai eu tout aussi dur avec HMG2L1... Ma grand-mère a une phrase pour expliquer cela : « on revient toujours au point que l'on a évité par un chemin différent ». En général, je ne crois pas au destin mais là il faut bien avouer que c'est troublant. Merci à toi Delphine et félicitations, tu as gagné ton pari et j'ai été deux fois papa durant la thèse !

Elise, sacrée Elise. Certainement le caractère le plus trempé du laboratoire, et du coup forcément cela a engendré quelques étincelles. Mais, cela ne nous a pas empêchés de nous apprécier. Encore désolé pour le « piano à queue », mais vraiment c'était trop tentant ce jour là (n'est-ce pas Christian ?). Du coup, depuis j'ai vu le film et finalement il est plutôt bon. Je te souhaite le meilleur et j'espère que tu réussiras ta carrière scientifique, tu le mérites !

Christian, mon cher symbiote à connerie (vous m'excuserez ce terme), parce qu'il est vrai qu'en général il nous suffisait de nous regarder pour avoir le même jeu de mot ou la même remarque piquante (cf. le piano à queue) ! Je ne sais pas si des psychiatres sauraient expliquer le phénomène, il me paraît tellement irrationnel. Que de grandes et profondes discussions nous avons pu avoir en présence de Mike, Elise ou encore Delphine. Tu as tout de même toujours été le plus pessimiste de nous tous, même si ma pensée rejoignait la tienne par moments. La vie peut, c'est vrai, ressembler par moments au film Seven, mais heureusement il y a tellement d'autres raisons d'être heureux ! Ceci dit, maintenant que tu as réalisé ton rêve, tu devrais revoir la vie avec moins de noirceur, du moins je te le souhaite ! J'espère que tu as « pris la mesure » de ce qui t'attend durant ces prochaines années et que tu ne te « casseras pas les dents » sur ces nouvelles études !

Mike, mon cher collègue luxembourgeois. Non, rassure-toi je ne t'embêterai pas avec ta nationalité, je l'ai assez fait durant ces dernières années ! Pour le coup, tu es plus ou moins le contraire de Christian : confiant en l'homme et surtout un des seuls eurooptimistes que je connaisse encore. Néanmoins, tu as dernièrement revu à la baisse ta confiance avec ces

fameux 90%... Je ne peux en dire plus mais ce fut un énorme choc pour nous tous ;) Mais, quoi qu'il advienne, les problèmes rencontrés en salle de culture cellulaire demeureront, ainsi va la vie ! Merci à toi pour les nombreuses discussions, pour ta patience (je l'ai éprouvée plus d'une fois, d'ailleurs n'oublie pas de resolubiliser des siRNA !) et pour le déménagement bien sûr ! Tu me donneras de tes nouvelles pour que je puisse dire à Noah que tu vas bien ! Je te souhaite le meilleur pour la suite, et surtout, j'espère que les moules repeupleront bientôt à nouveau les rivières du Luxembourg !

Carole, notre dernière venue et assurément un autre très fort caractère ! En tout cas, s'il y a bien une chose qui m'impressionne chez toi, c'est ta ténacité et le boulot que tu abats depuis que tu es dans l'équipe ! Bon courage à toi pour les prochaines années et du coup maintenant c'est un nouveau cycle de doctorantes féminines qui débute avec l'arrivée d'Eléa.

Eléa, du coup tu commences quand je m'en vais. Toutes mes félicitations pour ton allocation ministérielle et merci pour les moments passés lors de ton stage. Tu disais toujours « c'est magique » même quand cela ne fonctionnait pas ou pour des cellules qui n'exprimaient que de la GFP ;). Nous avons vu passer d'autres stagiaires depuis et crois-moi ils ne t'arrivaient pas à la cheville (demande à Aurélia). Du coup, tu mérites bien ta place dans cette superbe équipe ! Bonne chance à toi !

Giuditta, many thanks for your happiness and for the discussions we had together in our office ! I wish you the best for the future, though I'm almost convinced that you'll become a great researcher (I'll check on pubmed) !

Olga, merci à toi pour les bonnes idées ou remarques qui font très souvent avancer la science ! Je te souhaite réussite professionnelle et bonheur familial avec ce nouveau membre qui est venu agrandir ta famille !

Barbara, ta bonne humeur et ton sourire aiguaient tous les jours le laboratoire ! Merci à toi pour l'aide apportée lors des expériences d'anisotropie et bonne chance pour la suite !

Anne, ma grande concurrente dans la famille tête de cochon ! Bon, je ne pense pas qu'il soit si facile de nous départager mais honnêtement tu as un peu d'avance... Et comme tu

cours vite, je ne te rattraperai certainement jamais ! C'était un plaisir de travailler à tes côtés et tes conseils en clonage m'ont souvent servis ! Merci et bonne continuation !

Marie-Élise, du coup nous ne nous sommes finalement que croisés étant donné que j'ai commencé ma rédaction juste après ton arrivée. Merci pour les mots échangés et bon courage pour la suite !

Enfin, je n'oublie pas les anciens du labo que j'ai croisés comme Claude, Patrick, Rosy et Véronique et les voisins de pallier que sont les équipes MDT et REIC ! Ce fut un réel plaisir de travailler avec vous au quatrième étage !

Et puis, que serais-je sans ma famille ? Merci à toi Anaïs pour ton soutien sans faille et ta patience même si ce n'était pas facile tous les jours ! Je me souviens des premières années que nous avons vécues à Illkirch, lorsque j'allais au labo le samedi, dès fois le dimanche et que je te laissais seule avec notre premier enfant. Tu ne comprenais d'ailleurs pas toujours ce que je pouvais faire avec ces cellules ! Non, non, ce ne sont pas mes amantes, promis ;) ! Merci à vous trois, Anaïs, Noah et Louise parce que vous avez toujours été mon rayon de soleil quotidien, surtout dans les périodes de doutes scientifiques. Une famille, cela n'a vraiment pas de prix !

Merci à mes parents bien-sûr, sans qui je ne serais pas là : ni vivant ni en passe de soutenir ma thèse. Vous m'avez donné la vie mais vous m'avez aussi permis de faire des études à propos desquelles vous ne compreniez dès fois pas grand chose. Vous m'avez toujours laissé libre de faire mes choix, et c'est le plus beau des cadeaux ! Du coup, cette thèse c'est aussi une sorte de récompense, même si vous auriez tant voulu que j'aie en post-doc à Cambridge ;)!

Merci aux autres membres de la famille qui m'ont soutenu et qui seront également présents le jour de la soutenance. C'est vraiment un beau cadeau que vous me faites.



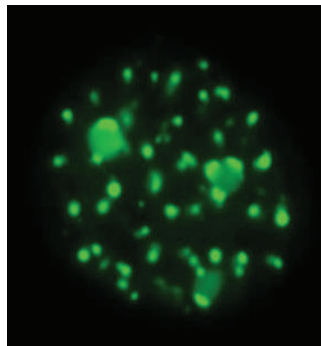
**Thèse présentée pour obtenir le grade de
Docteur de l'Université de Strasbourg**

**Discipline : Sciences de la Vie
Spécialité : Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie**

Par Thomas KALISCH

**Caractérisation biochimique et fonctionnelle d'un nouveau
partenaire de la Poly(ADP-ribose) Polymérase-1 :
High-mobility group protein 2-like 1 (HMG2L1)**

Thèse soutenue publiquement le 26 septembre 2013



Membres du jury :

Rapporteur externe : Pr Olga LAVRIK

Rapporteur externe : Dr Javier OLIVER

Examinateur interne : Pr Bruno CHATTON

Directeur de thèse : Dr Valérie SCHREIBER

Equipe « Poly(ADP-ribosyl)ation et intégrité du génome
UMR7242 – BSC – CNRS
Bd Sébastien Brant – BP10413 – 67412 ILLKIRCH Cedex

Table des matières

TABLE DES MATIÈRES

Table des matières	1
Liste des figures et tableaux	9
Liste des abréviations et acronymes	13
INTRODUCTION	21
I. La poly(ADP-ribosyl)ation	23
1. Le NAD ⁺	23
2. L'ADP-ribosylation.....	24
3. La poly(ADP-ribosyl)ation.....	25
4. Le catabolisme du PAR.....	26
5. L'impact du PAR sur les protéines.....	28
Publication 1	29
5.1. Le motif d'interaction au PAR (PAR binding motif).....	31
5.2. Le domaine macro.....	31
5.3. Le domaine PBZ.....	32
5.4. Le domaine WWE.....	32
II. La famille PARP	34
1. Classification des membres de la famille PARP.....	34
2. Les PARPs ADN-dépendantes.....	37
2.1. PARP-1/ARTD1.....	37
2.2. PARP-2/ARTD2.....	40
2.3. PARP-3/ARTD3.....	41
3. Les tankyrases/ARTD5 et ARTD6.....	42
4. Les PARPs à doigt de zinc.....	43
4.1. Ti-PARP/ARTD14.....	43
4.2. PARP-12/ARTD12.....	43
4.3. PARP-13/ARTD13.....	44
5. Les macro-PARPs.....	44
5.1. PARP-9/ARTD9.....	44
5.2. PARP-14/ARTD8.....	45
5.3. PARP-15/ARTD7.....	45

6. Les autres PARPs	45
6.1. PARP-4/ARTD4.....	46
6.2. PARP-6/ARTD17	46
6.3. PARP-10/ARTD10	46
6.4. PARP-16/ARTD15	47
6.5. PARP-8 et -11/ARTD16 et ARTD11	47
III. Les fonctions des PARPs et du PAR.....	48
1. Organisation, expression et intégrité du génome	48
1.1. Les mécanismes d'action des PARPs sur la chromatine.....	48
1.1.1. L'action directe de PARP-1 sur la chromatine	48
1.1.2. L'action indirecte de PARP-1 et de PARP-2 sur la chromatine.....	50
1.1.2.1. La modification de la composition des nucléosomes	50
1.1.2.2. La modulation de la chromatine par des facteurs de remodelage	51
1.1.2.3. La modification du paysage épigénétique.....	51
1.1.2.4. La modulation de la méthylation de l'ADN	52
1.2. La régulation de l'expression des gènes.....	52
1.2.1. Les PARPs contrôlent la transcription en modulant la chromatine	54
1.2.2. Les PARPs sont des co-régulateurs de la transcription	55
1.2.3. Les PARPs sont des facteurs de transcription ?	57
1.2.4. La régulation de la méthylation de l'ADN	57
1.3. La surveillance de l'intégrité du génome	58
1.3.1. La réparation des cassures simple-brin	59
1.3.2. La réparation des cassures double-brin.....	62
2. Les PARPs dans les processus de mort cellulaire	65
2.1. L'apoptose	65
2.2. La nécrose induite par PARP-1.....	66
2.3. L'apoptose caspases-indépendante	66
2.4. L'autophagie	67
3. Les PARPs dans la division cellulaire	67
4. PARPs : maladies et thérapies.....	68
IV. HMG2L1, une nouvelle protéine à HMGbox.....	71
1. Les protéines à domaine HMG.....	71
2. HMG2L1	72
2.1. Description générale.....	72
2.2. Les fonctions connues de HMG2L1.....	73

2.2.1. Régulateur de la voie Wnt.....	73
2.2.1. Régulateur de la différenciation des muscles lisses	75
2.2.2. HMG2L1 appartient à un complexe de remodelage de la chromatine	75
2.2.3. Activateur du transposon sleeping-beauty	76
V. Le nucléole, centre de synthèse du ribosome	77
1. Structure du nucléole.....	77
2. La transcription	77
3. Le contrôle de la transcription des ADNr.....	80
3.1. Le contrôle épigénétique de la transcription.....	81
3.2. Le contrôle de la transcription par modifications post-traductionnelles.....	81
4. La maturation du pré-ARNr.	84
5. Le rôle des PARPs dans le nucléole	86
5.1. L'hétérochromatinisation de l'ADNr.....	87
5.2. La maturation des ARNr et l'assemblage des ribosomes.....	88
VI. Objectifs du projet de recherche.....	90
RESULTATS.....	93
I. HMG2L1, un nouveau partenaire de PARP-1.....	95
1. Introduction	95
Publication 2 (article en cours de finalisation).....	97
2. Résultats	132
2.1. HMG2L1 est une protéine intrinsèquement désordonnée.....	132
2.2. HMG2L1 contient un domaine HMG	133
2.3. HMG2L1 contient un domaine C-terminal inconnu ultra-conservé.....	134
2.4. HMG2L1 interagit avec PARP-1 et le PAR et est poly(ADP-ribosyl)ée	135
2.5. HMG2L1 est localisée dans le nucléole	138
2.6. Recherche d'interactants de HMG2L1 par spectrométrie de masse.....	145
2.7. Les interactions protéiques ne sont pas modulées par le PAR.....	145
3. Discussion et perspectives	147
II. Purification de HMG2L1	149
1. Introduction	149
2. Résultats	151
2.1. 1 ^{ère} étape : colonne d'héparine	151
2.2. 2 ^{ème} étape : colonne HiTrap.....	153
2.3. Vérification de la purification	154

3. Discussion et perspectives	156
III. HMG2L1 lie les acides nucléiques	158
1. Introduction	158
2. Résultats	158
2.1. HMG2L1 lie l'ADN de manière séquence-indépendante	158
2.2. Le PAR entrave la liaison de HMG2L1 avec l'ADN	161
2.3. HMG2L1 lie l'ARN de manière séquence-indépendante	161
2.4. Le PAR entrave la liaison avec l'ARN	162
3. Discussion et perspectives	163
IV. HMG2L1 : une chaperonne à ARN ?	164
1. Introduction	164
2. Résultats	165
2.1. HMG2L1 exerce une activité ARN chaperonne	165
2.2. HMG2L1 favoriserait l'appariement de brins	167
3. Discussion et perspectives	168
V. HMG2L1 dans la biogenèse des ribosomes	171
1. Introduction	171
2. HMG2L1 ne semble pas contrôler la transcription des ADNr.....	171
2.1. La surexpression de HMG2L1 entraîne un arrêt de la transcription des ADNr.....	171
2.2. La déplétion de HMG2L1 n'a pas d'impact sur la transcription des ADNr.....	173
3. HMG2L1 dans l'assemblage du ribosome.....	175
4. Discussion et perspectives	175
Conclusion générale	178
1. HMG2L1, une protéine mieux caractérisée	180
1.1. Une protéine à domaine HMG intrinsèquement désordonnée.....	180
1.2. Une protéine nucléolaire.....	181
1.3. Un lien étroit avec les PARPs.....	181
2. Caractérisation fonctionnelle de HMG2L1	182
2.1. HMG2L1 dans la modulation de la transcription	182
2.2. HMG2L1 dans la biogenèse des ribosomes.....	182
Annexes techniques.....	184
I. Matériels	186
1. Lignées cellulaires.....	186
2. Constructions plasmidiques	186

3. Anticorps	186
4. SiARN et oligonucléotides.....	187
II. Méthodes	188
1. Purification de nucléoles	188
2. Etude de la transcription des ADNr par incorporation de BrUTP	189
3. Etude de la transcription des ADNr par RT-qPCR	190
3.1. Déplétion des cellules en HMG2L1 ou nucléoline	190
3.2. Purification des ARN et rétrotranscription.....	190
3.3. Quantification de l'expression des gènes par RT-qPCR.....	191
4. Purification de 6his-HMG2L1	191
4.1. Production de la protéine dans <i>E. coli</i>	191
4.2. Lyse des bactéries	192
4.3. Colonne d'héparine.....	192
4.4. Colonne HiTrap	192
4.5. Dialyse, concentration et quantification	193
Publication 3	194
Bibliographie	196

Liste des figures et tableaux

FIGURES

Figure 1 : la structure du nicotinamide adénine dinucléotide	23
Figure 2 : la réaction d'ADP-ribosylation	24
Figure 3 : la structure du poly(ADP-ribose)	26
Figure 4 : le métabolisme du poly(ADP-ribose)	27
Figure 5 : les domaines de liaison au PAR	33
Figure 6 : la classification de la famille PARP en fonction des domaines associés	36
Figure 7 : structure modulaire de PARP-1 humaine et fonctions des domaines.....	38
Figure 8 : mode d'activation de PARP-1 en réponse aux DSB	39
Figure 9 : homologie structurale des domaines catalytiques de PARP-1, -2, -3	41
Figure 10 : la modulation de la structure de la chromatine par PARP-1	49
Figure 11 : modes d'action de PARP-1 sur la régulation de la transcription.....	53
Figure 12 : schéma simplifié du mécanisme du BER/SSBR.....	60
Figure 13 : schéma récapitulatif des rôles des PARPs sur le dite du dommage.....	64
Figure 14 : l'intérêt thérapeutique de l'inhibition des PARPs	69
Figure 15 : structure tridimensionnelle du domaine HMG en association avec l'ADN ..	72
Figure 16 : les PARPs et les protéines HMG dans la voie Wnt/ β -caténine	74
Figure 17 : la structure du nucléole et l'assemblage du ribosome	78
Figure 18 : structure du complexe de transcription sur le promoteur du gène ADNr	79
Figure 19 : la modulation de la transcription des ADNr	80
Figure 20 : suppresseurs de tumeurs et oncogènes contrôlent la transcription des ADNr	84
Figure 21 : le processus de maturation du pré-ARNr chez l'homme	85
Figure 22 : PARP-1 dans le maintien de l'hétérochromatine de l'ADNr	87
Figure 23 : PARP-1 dans la biogenèse des ribosomes.....	89
Figure 24 : HMG2L1 est intrinsèquement désordonnée.	132
Figure 25 : HMG2L1 appartient à la classe II/III.....	134
Figure 26 : HMG2L1 contient un domaine C-ter très conservé	135
Figure 27 : HMG2L1 interagit avec PARP-2 <i>in vitro</i>	136
Figure 28 : PARP-2 hétéromodifie HMG2L1	137
Figure 29 : HMG2L1 interagit avec UBF via son domaine N-terminal.....	139
Figure 30 : HMG2L1 contient des NoLS putatifs.	139

Figure 31 : HMG2L1 s'accumule dans le nucléole transcriptionnellement actif	140
Figure 32 : Etablissement de la lignée stable GFP-HMG2L1	141
Figure 33 : la surexpression de GFP-HMG2L1 induit la diminution du niveau de détection de certaines protéines nucléolaires	142
Figure 34 : HMG2L1 surexprimée modérément est nucléolaire	143
Figure 35 : HMG2L1 est une protéine nucléaire et nucléolaire	144
Figure 36 : Validation de la protéomique par immunoprécipitation	146
Figure 37 : protocole de purification de HMG2L1	150
Figure 38 : Purification de 6his-HMG2L1 sur héparine	152
Figure 39 : les fractions à la sortie de l'héparine	153
Figure 40 : les fractions à la sortie de l'Hitrap	154
Figure 41 : vérification de la protéine purifiée par western-blot	156
Figure 42 : Les mécanismes potentiels des chaperonnes à ARN	164
Figure 43 : structures I et II prises par l'ARN	166
Figure 44 : le test d'activité chaperonne ARN <i>in vitro</i>	167
Figure 45 : autres tests d'activité chaperonne à ARN <i>in vitro</i>	168
Figure 46 : tests d'activité chaperonne à ARN <i>in vivo</i>	170
Figure 47 : la surexpression de HMG2L1 induit un arrêt de la transcription des ADNr	172
Figure 48 : L'absence de HMG2L1 n'a pas d'impact sur la transcription des ADNr ...	174
Figure 49 : Northern-blot ciblant les intermédiaires de la maturation du pré-ARNr...	177

TABLEAUX

Tableau 1 : classification de la famille PARP en fonction de l'activité catalytique	35
Tableau 2 : séquences des ADN et de l'ARN utilisés	159
Tableau 3 : structures des ADN et de l'ARN utilisés	159
Tableau 4 : liste des anticorps utilisés	187
Tableau 5 : liste des oligonucléotides pour la RT-qPCR	187

Liste des abréviations et acronymes

LISTE DES ABREVIATIONS ET ACRONYMES

53BP1 : tumor suppressor p53 binding protein 1

ADN : acide désoxyribonucléique

ADNc : acide désoxyribonucléique complémentaire

ADNr : acide désoxyribonucléique ribosomique

ADP-ribose : adénosine diphosphate-ribose

AHR : aryl hydrocarbon receptor

AIF : apoptosis-inducing factor

ALC1 : amplified in liver cancer 1

AMPK : AMP-activated protein kinase

ANK : ankirin

APLF : aprataxin and PNK-like factor

ARH 1/3 : ADP-ribose hydrolase 1/3

ARN : acide ribonucléique

ARNr : acide ribonucléique ribosomique

ATM : ataxia telangiectasia mutated

ATP : adénosine tri-phosphate

BAL : B-aggressive lymphoma protein

BAP18 : BPTF-associated protein of 18 kDa

BBAP : B-lymphoma and BAL associated protein

BER : base excision repair

BPTF : bromodomain PHD-finger transcription factor

BRCA 1/2 : breast cancer type 1/2 susceptibility protein

BRCT : BRCA1-Cterminus

CDK1 : cyclin-dependent kinase 1

CDK2 : cyclin dependent kinase 2

CENPA/B : centromere protein A/B

CHFR : checkpoint with forkhead (FHA)-associated and really interesting new gene (RING) finger domain

CoaSt6 : collaborator of STAT6
CPAP : centrosomal P4.1 associated protein
CTCF : CCCTC binding factor
CXCL1 : chemokine (C-X-C motif) ligand 1

DNA-PKcs : DNA-dependent protein kinase catalytic subunit
DNMT1 : DNA methyltransferase 1
DSB : double-strand break
DSBR : double-strand break repair

ERK : extracellular signal regulated kinase

FACT : facilitates chromatin transcription
FUS : fused in sarcoma

GFP : green fluorescent protein
GSK3 : glycogen synthase kinase 3

HA : hémagglutinine
HBP1 : HMGbox protein1
HMG : high mobility group
HMG2L1 : high-mobility group protein 2-like 1
HMGA : HMG-AT hook family
HMGB : HMB-box family
HMGN : HMG-nucleosome binding family
HPS : répétitions histidine-proline-sérine
HR : homologous repair

IGF1 : insulin-like growth factor I
IRES : internal ribosome entry site

KDM4D : lysine (K) specific demethylase 4D
KDM5B : lysine (K) specific demethylase 5B

LEF : lymphoid enhancer binding factor

MART : mono(ADP-ribose) transférases

mTOR : mammalian target of rapamycin

MudPIT : multidimensional protein identification technology

MVP : major vault protein

NAD : nicotinamide adénine dinucléotide

NES : nuclear export signal

NFAT : nuclear factor of activated T-cells

NF- κ B : nuclear factor- κ B

NHEJ : non-homologous end-joining

NLK : nemo-like kinase

NLS : signal de localisation nucléaire

NoLS : signal de localisation nucléolaire

NOR : nucleolar organizer region

NoRC : nucleolar remodeling complex

NPM : nucleophosmin (ou B23)

NuMA : nuclear mitotic apparatus protein 1

NURF : nucleosome remodeling factor

PAR : poly(ADP-ribose)

PARG : poly(ADP-ribose) glycohydrolase

PARP : poly(ADP-ribose) polymérase

PBZ : PAR-binding zinc finger

PCNA : proliferating cell nuclear-antigen

PDB : protein databank

PIASy : protein inhibitor of activated STAT Y)

RFP : red fluorescent protein

RIG1 : retinoic acid inducible gene1

RMN : résonance magnétique nucléaire

ROS : reactive oxygen species

RRM : RNA recognition motif

RSK : ribosomal S6 kinase

RT-qPCR : real-time-quantitative polymerase chain reaction

SAM : steril alpha motif

SIRT1 : sirtuin 1

SIRTuin : silent information regulator two (sir2) protein

SNF2H : sucrose nonfermenting protein2 homolog

snoARN :small nucleolar ARN

snoRNP : small nucleolar ribonucleoprotein

SRF : serum response factor

SSB : single-strand break

SSBR : single-strand break repair

SSRP1 : structure specific recognition protein 1

STAT6 : signal transducer and activator of transcription 6

TAF : TBP-associated factor

TBP : TATA-binding protein

TCDD : 2,3,7,8-tétrachlorodibenzo-p-dioxine

TCF : T-cell factor

TEP1 : telomerase associated protein 1

TFIIH : transcription factor IIH

TIF1 β : transcription intermediary factor 1 β

TIP5 : TTF1-interacting protein5

TRF1/2 : telomeric repeat binding factor 1/2

TTF1 : termination transcription factor 1

TTF-1 : thyroid transcription factor-1

UBF : upstream binding factor

UIM : ubiquitin interacting motif

VIT : vault inter α trypsin

vWA : von Willebrand factor type A

WDR3 : WR repeat containing protein 3

WGR : motif protéique à résidus tryptophane-glycine-arginine répétés

WWE : résidus conservés tryptophane-tryptophane-glutamate

XRCC1 : X-ray repair cross-complementing protein 1

YFP : yellow fluorescent protein

ZAP : zinc finger antiviral protein

ZAPS : zinc finger antiviral protein short isoform

ZBD : zinc binding domain

INTRODUCTION

I. La poly(ADP-ribose)ation

La poly(ADP-ribose)ation est une modification post-traductionnelle des protéines catalysée par une famille d'enzymes : les Poly(ADP-Ribose) Polymérase ou PARPs. Elles utilisent le Nicotinamide Adénine Dinucléotide⁺ ou NAD⁺ comme substrat pour transférer une unité d'ADP-ribose (Adénosine DiPhosphate-ribose) sur une protéine acceptrice ou sur un polymère d'ADP-ribose en formation.

1. Le NAD⁺

Le NAD est un coenzyme d'oxydo-réduction présent dans la cellule sous deux formes : le NAD⁺ qui est la forme oxydée et le NADH qui est la forme réduite. Il est composé de deux nucléotides liés par leur phosphate respectif, l'adénosine monophosphate et le nicotinamide mononucléotide (**figure 1**).

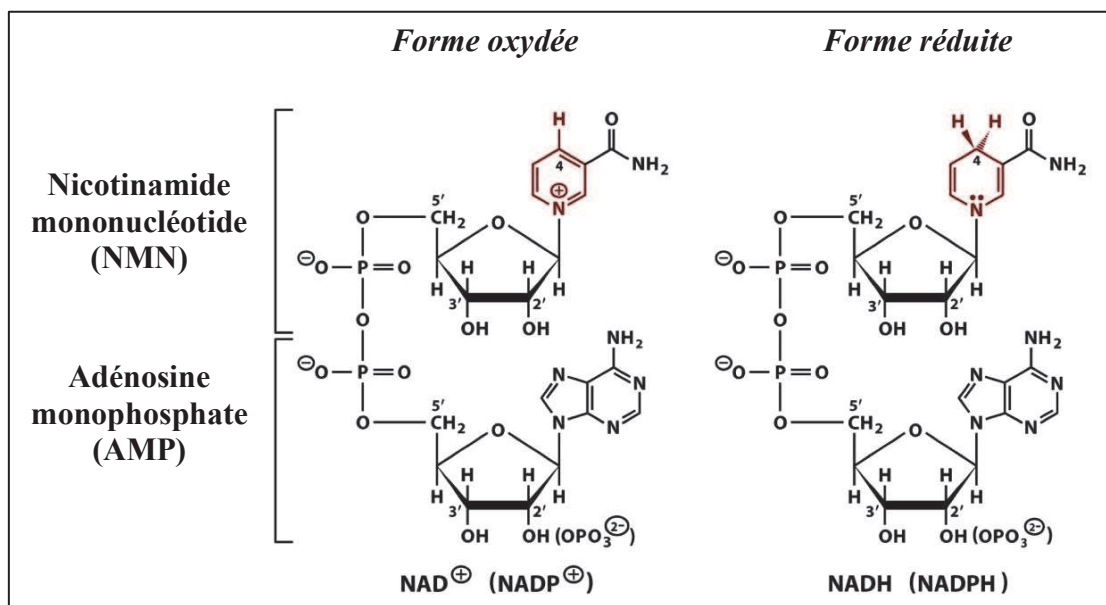


Figure 1 : la structure du nicotinamide adénine dinucléotide

Il est essentiellement impliqué dans le métabolisme énergétique de la cellule mais également dans diverses voies de signalisation comme précurseur de messagers secondaires. Parallèlement, il est substrat de deux familles d'enzymes distinctes : les SIRTuins (Silent Information Regulator Two (Sir2) protein) et les PARPs (Koch-Nolte et al., 2011).

Les SIRTuins désacétylent – en transférant le groupe acétyle sur l’ADP-ribose du NAD^+ – ou mono(ADP-ribosyl)ent les protéines, ce qui leur permet de réguler la réponse cellulaire au stress, la transcription ou encore le métabolisme cellulaire (Feldman et al., 2012).

Les PARPs et les MARTs (Mono(ADP-Ribose) Transférases) catalysent quant à elles la réaction d’ADP-ribosylation que nous allons décrire dans les paragraphes qui suivent.

2. L’ADP-ribosylation

L’ADP-ribosylation définit le transfert d’un groupe ADP-ribose du NAD^+ vers une protéine acceptrice catalysé par une PARP ou une MART (**figure 2**).

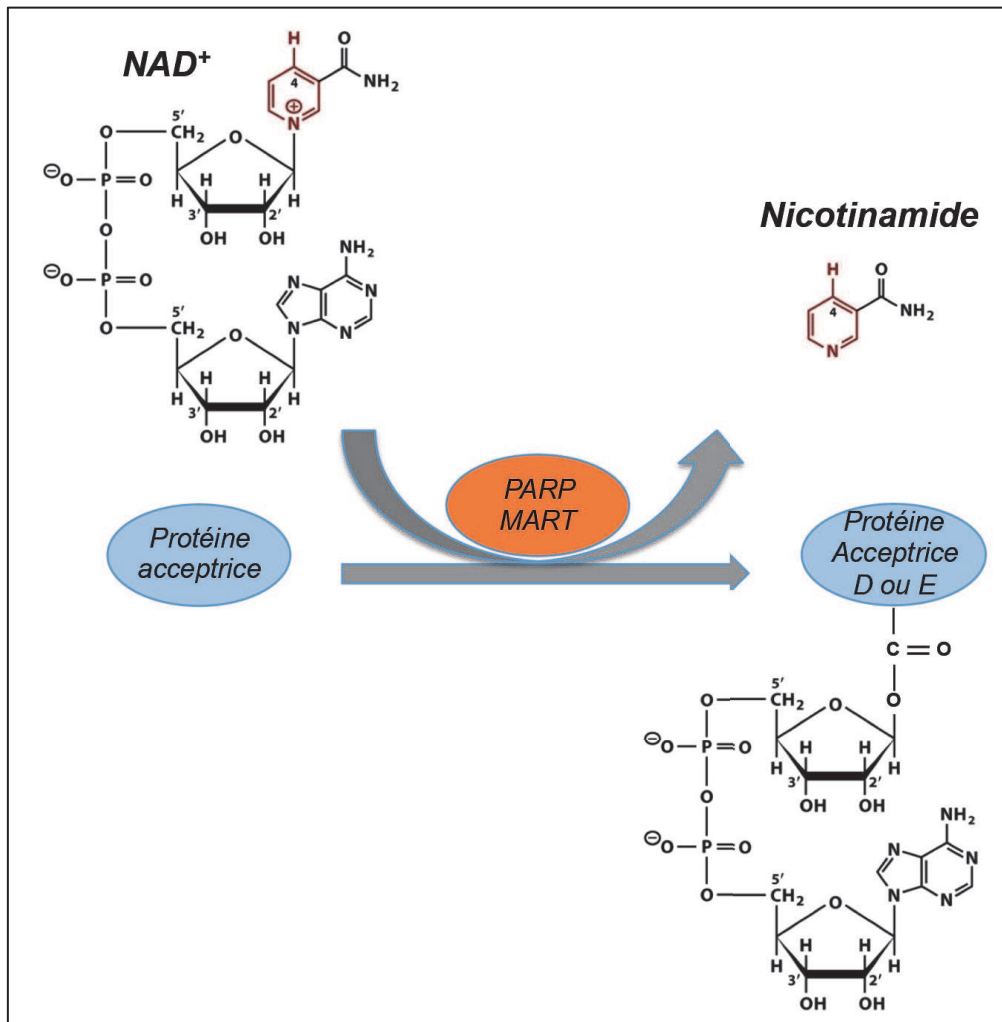


Figure 2 : la réaction d'ADP-ribosylation

Ce schéma illustre la réaction d’ADP-ribosylation catalysée par les MARTs et les PARPs. Elles transfèrent un résidu d’ADP-ribose provenant du NAD^+ pour le lier covalamment à des résidus aspartate et glutamate au niveau des fonctions carboxyliques ou à des résidus lysine et arginine sur les fonctions amine (non illustré ici). La réaction libère une molécule de nicotinamide.

La réaction implique dans un premier temps le clivage de la liaison glycosidique entre le ribose et le nicotinamide, libérant ainsi ce dernier. Le nicotinamide peut être recyclé et une nouvelle molécule de NAD^+ sera formée moyennant la consommation d'ATP, ce qui peut s'avérer très énergivore en cas de poly(ADP-ribosyl)ation excessive (Chiarugi et al., 2012). Dans un deuxième temps, l'ADP-ribose est covalamment lié à un résidu glutamate, aspartate, lysine ou arginine de la protéine acceptrice, et ce sur les fonctions carboxyle (D ou E, formant une liaison ester) et amine (K ou R, formant une liaison kétamine) (Altmeyer et al., 2009; Chapman et al., 2013; Gibson and Kraus, 2012; Tao et al., 2009).

Cette modification peut avoir lieu sur les PARPs elles-mêmes, nous parlerons alors d'automodification par opposition à l'hétéromodification qui cible les autres protéines.

3. La poly(ADP-ribosyl)ation

La poly(ADP-ribosyl)ation consiste en la formation d'un polymère d'ADP-ribose (PAR) catalysé par des PARPs uniquement. Ces dernières sont capables de synthétiser un polymère linéaire ou branché pouvant atteindre 200 résidus *in vitro*. Cette réaction se déroule en 3 étapes distinctes : l'**initiation** durant laquelle la PARP transfère un résidu d'ADP-ribose sur un acide aminé de la protéine acceptrice (**figure 2**), l'**élongation** qui se fait par ajout d'ADP-ribose via une liaison O-glycosidique ribose-ribose $2' \rightarrow 1''$ et le **branchement** caractérisé par une liaison O-glycosidique ribose-ribose $2'' \rightarrow 1'''$ (**figure 3**). La taille du PAR est variable et dépend du niveau d'activation des PARPs, quant aux branchements ils interviennent entre 20 et 50 réactions d'élongation (Gibson and Kraus, 2012). En outre, la taille dépend également de la PARP, en effet PARP-1 et PARP-2 peuvent synthétiser des polymères de 200 unités contre 100 pour la tankyrase 1 ou encore 15 seulement pour PARP-3 (Ame et al., 1999; Rippmann et al., 2002; Rulten et al., 2011).

Le PAR peut, du fait de sa structure et de sa forte densité de charges négatives, être considéré comme un acide nucléique. En outre, certaines études ont souligné sa probable structure hélicoïdale caractérisée par un empilement des bases adénine (Minaga and Kun, 1983; Schultheisz et al., 2009). Cette structure est néanmoins observée *in vitro* en présence d'une forte concentration en sels, ce qui signifie que dans des conditions pseudo-physiologiques le PAR ne prend aucune structure particulière.

Le PAR a donc certainement la capacité de s'adapter à ses interactants et il aura un impact considérable sur les protéines acceptrices ou celles avec lesquelles il interagit non-covalamment.

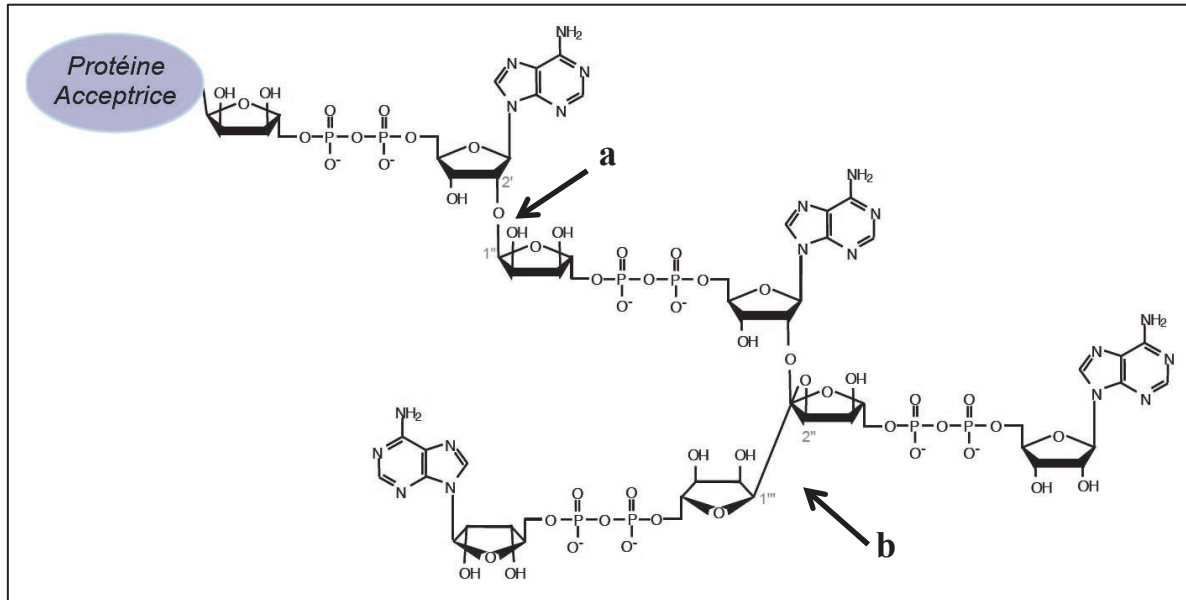


Figure 3 : la structure du poly(ADP-ribose)

Le PAR est un polymère d'unités ADP-ribose liées covalamment les unes les autres par des liaisons glycosidiques 2'-1'' (flèche a) et 2''-1''' (flèche b) dans le cas de branchements.

4. Le catabolisme du PAR

La poly(ADP-ribosyl)ation agit sur de nombreux processus cellulaires qui demandent à être finement modulés, cela demande donc une régulation scrupuleuse du métabolisme du PAR. La synthèse comme la dégradation du PAR sont des étapes extrêmement contrôlées afin que le mécanisme soit le plus dynamique possible. Ainsi, il a été montré que la durée de vie moyenne du PAR produit en réponse à des agents endommageant l'ADN est de l'ordre de 1 minute pour ~7h en conditions normales (Alvarez-Gonzalez and Althaus, 1989).

Plusieurs enzymes interviennent dans le catabolisme du PAR : la PARG (Poly(ADP-Ribose) Glycohydrolase) et l'ARH3 (ADP-Ribose Hydrolase 3) sont capables de dégrader le PAR sur des protéines poly(ADP-ribosyl)ées mais ne peuvent retirer le dernier résidu lié à la protéine par une liaison ester ou kétamine (**figure 4**). Les enzymes ARH1, MacroD1, MacroD2 et C6orf130 possèdent une activité ADP-ribosyl-lyase qui leur permet de retirer le dernier résidu d'ADP-ribose lié à la protéine acceptrice (Gibson and Kraus, 2012; Jankevicius et al., 2013; Rosenthal et al., 2013).

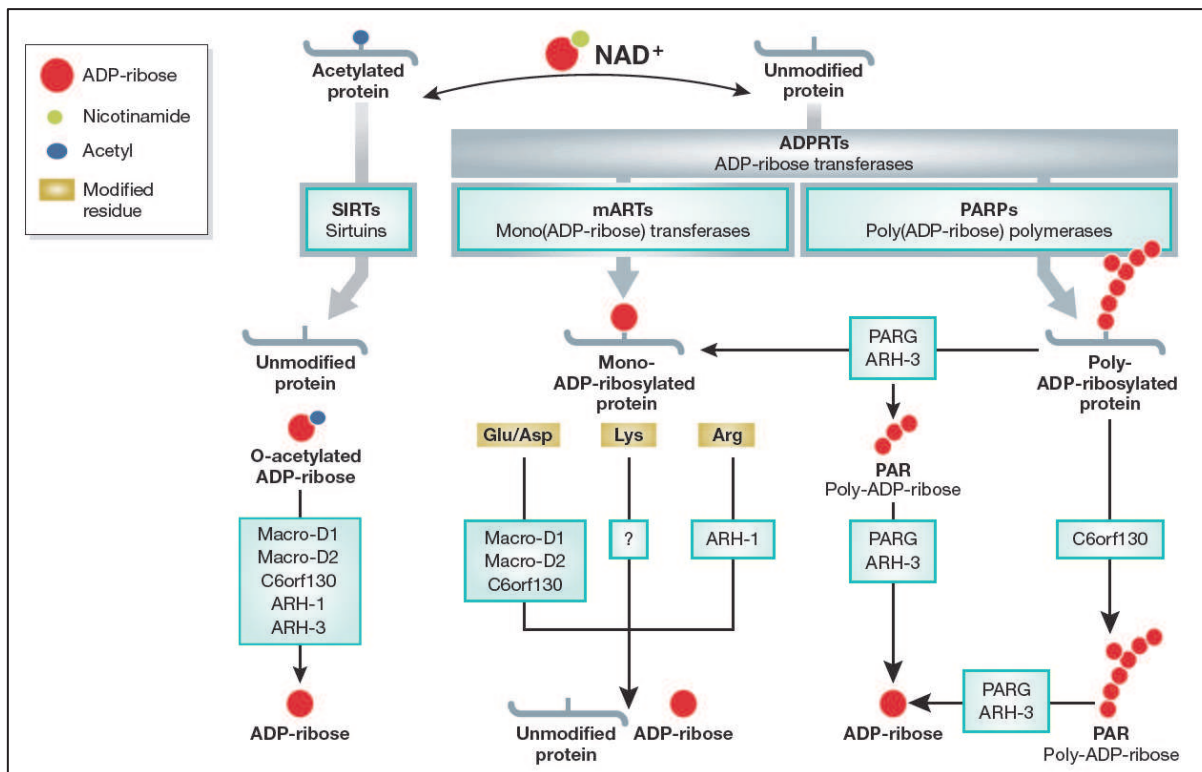


Figure 4 : le métabolisme du poly(ADP-ribose)

Illustration montrant les différentes phases du métabolisme du PAR. Du haut vers le bas, le schéma présente les étapes du métabolisme de l'ADP-ribose, de l'anabolisme vers le catabolisme. Les MARTs et les PARPs hétéromodifient des protéines acceptrices sur des résidus glutamate, aspartate, lysine ou arginine. Les enzymes capables de dégrader le PAR sont la PARG et l'ARH-3, elles libèrent des molécules de PAR ou d'ADP-ribose libres. Les enzymes capables de cliver la liaison particulière entre le dernier résidu d'ADP-ribose et la protéine acceptrice sont spécifiques de l'acide aminé mis en jeu. Leur activité libère un ADP-ribose libre y compris quand elle clive la liaison entre l'acétyle et l'ADP-ribose issu du métabolisme des SIRTs. Figure adaptée d'après (Steffen and Pascal, 2013).

La PARG possède une activité endo- et exo-glycohydrolase qui lui permet de cliver les liaisons O-glycosidiques spécifiques au PAR, ce qui libère des quantités importantes de PAR ou d'ADP-ribose libres, pouvant jouer le rôle de messager secondaire dans les processus d'apoptose AIF (Apoptosis-Inducing Factor)-dépendante ou dans la signalisation du calcium (Blenn et al., 2011; Yu et al., 2002) (voir paragraphe III.2 pour l'apoptose).

Il a été montré récemment que le domaine catalytique de la PARG adopte en fait le repliement d'un domaine macro, ce qui expliquerait la manière avec laquelle la PARG reconnaît le PAR (Barkauskaite et al., 2013). A noter, que les enzymes précitées Macro-D1, Macro-D2 et C6orf130 possèdent également un domaine macro doué d'une activité catalytique (voir 5.2). Ce domaine semble donc être très fortement lié au catabolisme du PAR.

L'invalidation du gène de la PARG chez la souris entraîne une létalité embryonnaire précoce, tandis que sa déplétion dans des cellules humaines HeLa induit une plus forte sensibilité aux radiations ionisantes caractérisée par un défaut de réparation des SSB (Single-Strand Break) et DSB (Double-Strand Break) ainsi qu'une altération du point de contrôle mitotique (Ame et al., 2009; Koh et al., 2004).

5. L'impact du PAR sur les protéines

Compte-tenu de sa structure semblable aux acides nucléiques et donc de sa forte densité en charges négatives, la liaison covalente du PAR sur les protéines a des conséquences drastiques sur leurs structure et fonction. Il peut ainsi réguler une activité enzymatique, modifier les réseaux d'interactions ou encore la localisation des protéines. Les PARPs modifient une grande variété de protéines principalement nucléaires dont le nombre ne cesse d'augmenter. Les protéines cibles interviennent majoritairement dans le métabolisme des acides nucléiques : structure de la chromatine, réplication et réparation de l'ADN, mais aussi régulation de la transcription des gènes (D'Amours et al., 1999; Luo and Kraus, 2012).

Parallèlement, le PAR peut également interagir non-covalamment avec des protéines cibles qui contiennent un motif ou domaine protéique spécifique. Actuellement, quatre domaines différents sont décrits dans la littérature : le motif d'interaction au PAR ainsi que les domaines macro, WWE et PBZ (Poly(ADP-ribose) Binding Zinc finger ou doigt de zinc C2H2) (Ahel et al., 2008; Kalisch et al., 2012; Karras et al., 2005; Krietsch et al., 2012b; Pleschke et al., 2000; Wang et al., 2012).

Publication 1

New readers and interpretations of poly(ADP-ribosyl)ation

Thomas Kalisch, Jean-Christophe Amé, Françoise Dantzer and Valérie Schreiber

Trends in Biochemical Sciences (2012) vol. 37 (9) pp. 381-90

New readers and interpretations of poly(ADP-ribosyl)ation

Thomas Kalisch, Jean-Christophe Amé, Françoise Dantzer and Valérie Schreiber

Biotechnology and Cell Signaling, UMR7242 CNRS, Laboratory of Excellence Medalis, Université de Strasbourg, ESBS, Bd Sebastien Brant, BP 10413, 67412 Illkirch, France

Poly(ADP-ribosyl)ation (PARylation), a protein post-translational modification that was originally connected to the DNA damage response, is now known to engage in a continuously increasing number of biological processes. Despite extensive research and ceaseless, important findings about its role and mode of action, poly(ADP-ribose) remains an enigma regarding its structural complexity and diversity. The recent identification and structural characterization of four different poly(ADP-ribose) binding motifs represents a quantum leap in the comprehension of how this molecule can be decoded. Moreover, the recent discovery of a direct connection between PARylation and poly-ubiquitylation in targeting proteins for degradation by the proteasome has paved the way for a new interpretation of this protein modification. These two novel aspects, poly(ADP-ribose) recognition and readout by the ubiquitylation/proteasome system are developed here.

The diversity in origin, nature and outcome of PARylation

PARylation is a post-translational modification of proteins that is catalyzed by poly(ADP-ribose) polymerases (PARPs) [1–4]. PARP hydrolyses nicotinamide adenine dinucleotide (NAD⁺) and transfers the ADP-ribose (ADPR) moiety to acceptor proteins, including itself. The transfer of one ADPR unit leads to mono-ADP-ribosylation, whereas subsequent additions of ADPR units through 2',1''-O-glycosidic ribose-ribose bonds can lead to long and linear poly(ADP-ribose) (PAR) polymers; for some PARPs, an even more complex branched structure can be obtained through 2'',1'''-glycosidic bonds (Figure 1). PARPs form a family of 17 members in humans, all having in common a sequence homologous to the catalytic domain of the founding and most described PARP, PARP-1. Some members lack critical residues for PAR synthesis, and therefore display only mono-ADP-ribosyl-transferase (MART) activity (transfer of a single ADPR unit to acceptor protein), or are completely inactive [5].

PARylation is involved in many processes such as DNA repair, replication, chromatin structure, transcription, telomere homeostasis, chromosome segregation, cell differentiation, cell proliferation or cell death. From a physiological point of view, PARP activity has been directly linked to energy metabolism, spermatogenesis, innate

and acquired immunity, biological clock or memory [1–4]. Like any other post-translational modification, PARylation can modify the biochemical and functional properties of the target protein and as such, regulates protein–protein or protein–nucleic acid (both DNA and RNA) interactions. PAR is also receiving increasing attention as a signaling molecule, because it can define the outcome of a cell whose DNA integrity has been injured [6,7]. Another well-established function of PAR is to direct the recruitment of proteins to a defined site. This is particularly well-documented in the DNA damage response, in which PARP-1 rapidly detects DNA breaks through its nick-sensing activity, is activated, and synthesizes PAR, leading to the immediate recruitment of repair factors displaying one of the four known PAR-binding modules to the site of DNA damage (Box 1). Finally, much attention has been given in the past decade to investigating PARP inhibitors as an anticancer strategy. PARP-1 inhibition potentiates the killing efficiency of anticancer genotoxic drugs, and is synthetically lethal in tumors that are defective in the homologous recombination repair pathway (e.g. breast cancers with BRCA1 or BRCA2 mutations) [4,8,9] or, as recently shown, in Ewing's sarcoma cells [10].

The first described PAR-binding motif (PBM)

Felix Althaus's group made the seminal discovery of the existence of a dedicated PBM, which is present in a still-growing list of proteins [11] and was recently refined to 8 amino acids with the following pattern: [HKR]₁-X₂-X₃-[AIQVY]₄-[KR]₅-[KR]₆-[AILV]₇-[FILPV]₈ [12]. *In silico* prediction of PAR binding proteins using this pattern has established a catalog of proteins with potential PAR-binding capacity; many of which have been confirmed [12]. The function of these PAR-binding proteins covers many biological processes, but some pathways are over-represented, such as DNA repair, DNA metabolism, chromosome organization, RNA metabolism and cell cycle regulation. One prominent example of a DNA repair factor with a PBM is the base excision/single strand break repair factor X-ray repair cross-complementing gene 1 (XRCC1), which is rapidly recruited to sites of DNA damage where PAR has been produced by PARP-1 (Box 1). Even though the PBM was the first PAR-binding domain to be described, and some 3D structures of PBM-containing polypeptides have been solved [i.e. the BRCT1 domain of XRCC1 (PDB 2d8m) or the apoptosis inducing factor AIF] [6], no precise structural information about how PAR is recognized by a PBM is currently available. This is because, in contrast to

Corresponding author: Schreiber, V. (valerie.schreiber@unistra.fr).

Keywords: Poly(ADP-ribose); NAD⁺; ubiquitylation; post-translational modifications; macro domains; zinc fingers.

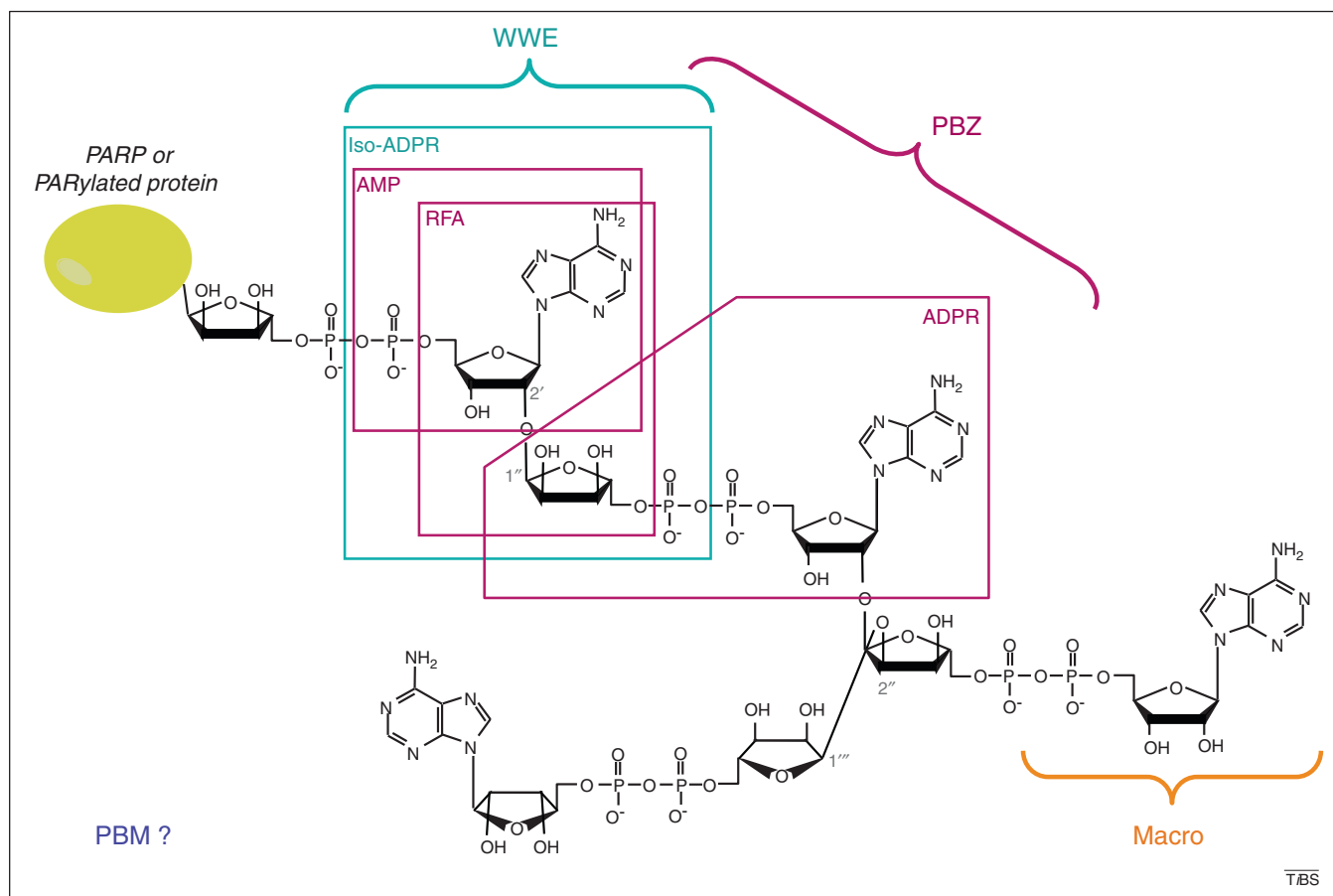


Figure 1. Structure of poly(ADP-ribose) (PAR) and recognition by PAR-binding motifs (PBMs). The chemical structure of branched PAR, covalently attached to an acceptor protein (which can be poly(ADP-ribose) polymerase itself), is shown. The characteristic linkages of linear (1→2' O-glycosidic bound) and branched (1→2'' O-glycosidic bound) are indicated. The brackets illustrate the region recognized by each PAR-binding domain. The ADP-ribose (ADPR) derivatives used in structural characterization of PAR-binding domains are framed. The RNF146 PAR-binding domain WWE was co-crystallized with iso-ADPR [46], supporting a mechanism of internal recognition of PAR. The solution structure of the two aprataxin and PNK-like factor (APLF) PAR-binding zinc fingers (PBZ motifs) bound to 2'-O-α-D-ribofuranosyl-adenosine (RFA) was solved by nuclear magnetic resonance (NMR) [38], whereas the CHFR PBZ domain was co-crystallized with AMP and ADPR [41]. This PBZ domain was also co-crystallized with P¹P²-diadenosine 5'-pyrophosphate (AMP2), which is not a derivative of PAR and thus cannot be illustrated in this scheme, but which supports the hypothesis that the PBZ motif recognizes two successive ADPR units. Macrodomains bind ADPR units, but capping of the 2'OH from ADP prohibits internal recognition of PAR [14,24]. How the PBMs recognize PAR remains unknown, as illustrated by the open question mark.

the three other PAR-binding modules described later, PBMs are not able to bind ADP-ribose monomers or derivatives besides PAR, thus preventing co-crystallization studies with such small PAR-derived molecules. Therefore, a characteristic of PBMs is their apparent lack of global structural conservation, because they can be interspersed within many types of functional domains, such as protein–protein or protein–nucleic acid interaction domains and nuclear localization or export signals, thus providing a regulatory role for PAR. The PBM basic amino acids, by forming an electropositive surface, probably favor interaction with the PAR molecule that is highly acidic due to the two phosphates per ADP-ribose unit.

The ADPR and PAR-binding macrodomain

The 130–190 amino acids, conserved macrodomain that was initially noted in the histone variant macroH2A [13], is found in all kingdoms of life. The first biochemical and structural evidence that macrodomains display ADPR-, and for some, PAR-binding activity, was reported for the macroprotein Af1521 from the thermophilic organism *Archaeoglobus fulgidus* [14]. That a bacterial protein could

bind PAR, a molecule that at the time was not supposed to be produced in lower organisms, was somewhat unexpected. The recent demonstration of a structural link between the macrodomain and the catalytic site of the enzyme responsible for degrading PAR, the PAR glycohydrolase (PARG), and the discovery of bacterial PARG activities has now shed light on this new finding, and challenges the conventional paradigm [15].

In humans, 10 genes encode 11 macrodomain-containing proteins, which display one to three iterations of the motif (Figure 2a) [16–18]. Of note, PARP-14 and PARP-15 combine a (mono)ADP-ribosylation activity (PARP-9 is likely inactive) together with an ADPR or even PAR binding activity [19,20]. However, if and how these two functional domains cooperate in the protein function is unknown. For example, both PARP-14 macrodomains and catalytic activity are involved in the regulation of interleukin (IL)-4-stimulated signal transducer and activator of transcription (Stat)6-dependent transcription [20,21], but whether they act in a cooperative manner remains to be determined.

Structures of macrodomains in complex with ADP-ribose derivatives are available for several human

Box 1. Binding to PAR, a mode of recruitment to DNA damage sites

One of the best characterized functions of PARP-1 is the efficient detection of DNA breaks, triggering the immediate synthesis of PAR on itself (auto-PARylation) and on chromatin-associated proteins such as histones. The role of these PARylations is to promote DNA repair by fostering an appropriate chromatin status and by quickly recruiting factors to restore DNA and chromatin integrity. The base excision and single strand break repair scaffold protein X-ray repair cross-complementing gene 1 XRCC1 is the first of an expanding list of proteins that have been found to be recruited to the DNA damage site through binding to PAR that has been generated by PARP-1. Recognition of PAR can involve any of the four PAR-binding modules. These proteins can be involved in the DNA repair process itself [e.g. XRCC1, DNA ligase III, polynucleotide kinase (PNK), meiotic recombination 11 (Mre11), APLF]; in the structure and remodeling of chromatin to control accessibility of the lesion and surrounding chromatin compaction (e.g. ALC1 and macroH2A1.1); in the repression of transcription [e.g. the nucleosome remodeling and deacetylase (NuRD), the repressor proteins chromodomain 4 (CHD4), metastasis tumor antigen-1 (MTA1) and polycomb proteins Enhancer of Zeste homolog 2 (EZH2), B lymphoma Mo-MLV insertion region 1 (BMI1), chromobox 4 CBX4]; and in the decision process for whether a damaged cell will engage either a cell survival or a cell death program (e.g. RNF146 and AIF). Several recent reviews and articles cover this topic in depth [1,4,66–69].

macroproteins (Figure 2a). These macrodomains show high structural homology, folding into a globular mixed α -helix/ β -sheet structure that forms a deep groove, which is the ligand-binding pocket. However, binding to PAR and even to monomeric ADPR is not a general property of macrodomains. MacroH2A1.1, which is involved in the DNA damage response and transcriptional regulation, is able to bind PAR, ADPR and the SirT1 metabolite O-acetyl-ADP-ribose (OAADPR), which is produced during the NAD⁺-dependent deacetylation of acetylated proteins [22]. By contrast, due to subtle but significant structural changes, its splicing variant macroH2A1.2, like macroH2A2, is unable to bind any ADPR derivatives [22–24].

How do macrodomains recognize PAR? The crystal structure of the macroH2A1.1 macrodomain in complex with ADPR has revealed that access to the 2' and 3' OH groups in the proximal ribose is blocked, precluding any interaction with the internal ADPR unit within PAR, and thus designating macrodomains as recognizers of the last residue of PAR chains (Figure 1) [24]. Mutation of an Asp residue prevents PAR binding of the structurally unresolved macrodomain of ALC1 (amplified in liver cancer 1); a protein involved in chromatin remodeling [25,26]. This Asp is highly conserved within macrodomains and is directly involved in ADPR binding, as shown for Af1521 [14] and macroH2A1.1 [18,23,24] where it engages in a hydrophobic bond with the NH₂ of the adenine.

Several macrodomains found in positive-strand RNA viruses (alphaviruses, hepatitis E virus and coronaviruses, including the severe acute respiratory syndrome coronavirus SARS-CoV) are able to bind PAR within infected animal cells [27–29]. This is an efficient strategy for viruses to hamper or hijack cellular pathways that are normally regulated by the host macroproteins. Some macrodomains have also been converted into powerful biological tools: the

bacterial Af1521 macrodomain has been used as a PAR-binder to validate *in vivo* or *in vitro* protein PARylation, notably when anti-PAR antibodies are not sufficiently sensitive (or efficient, if PAR is too short) to detect the modification [30,31].

Among the PAR-binding modules identified so far, macro is the only one for which an enzymatic activity on ADPR derivatives has been reported. Macrodomains from bacterial and viral proteins, and the human MDO1, MDO2 and orphan macrodomain (C6orf130) proteins display limited hydrolyzing activity on ADP-ribose-1''-phosphate, a metabolite generated during tRNA splicing, and/or on OAADPR [16,28,32]. No such OAADPR hydrolyzing activity has been detected for macroH2A1.1 despite its efficient binding to OAADPR [22]. Unfortunately, the very appealing hypothesis that macrodomains could hydrolyze PAR has never been validated, except for the macro-like PARG catalytic site [15,33]. The crystallographic structure of a DUF2263 fold from *Thermomonospora curvata*, a distant relative of the PARG fold, has revealed striking similarities to macrodomains [15]. This PARG macro-like catalytic domain shows the closest structural and evolutionary relation to a macrodomain that displays OAADPR-hydrolyzing activity, MacroD1 [33]. Similar to macrodomains, the bacterial PARG recognizes ADP-ribose, with an analogous steric restraint precluding internal recognition of PAR and thus supporting exo- but not endoglycohydrolase activity [15]. However, this raises the question of the conservation of this macro-like structure in mammalian PARGs, because mammalian PARGs are endowed with both exo- and endoglycohydrolase activities [34]. The first crystal structure of a mammalian PARG now gives some clarification [35]. In comparison to the bacterial PARG, the catalytic domain of rat PARG shows: an extended catalytic groove that can accommodate the (n+1) ADP-ribose; the lack of the ribose cap that blocks the 2'-OH of the adenosine ribose in *T. curvata* PARG and thus excludes recognition of internal glycosidic linkages of PAR; and the presence of a unique flexible tyrosine clasp directly involved in substrate binding [35]. These structural differences explain how mammalian PARG, in contrast to bacterial PARG, is capable of endoglycohydrolase activity. Comparison of all the 3D structures of macrodomains now available sheds light on how these domains can differently act as ADP-ribose, PAR or OAADPR binders or hydrolyzers.

The PAR-binding zinc finger (PBZ)

The tumor suppressor CHFR [checkpoint with forkhead (FHA)-associated and really interesting new gene (RING) finger domains] is a mitotic checkpoint protein that prevents entry into mitosis upon mitotic stress elicited by microtubule poisons [36]. Analysis of its primary sequence has identified a C2H2 zinc finger that has turned out to bind PAR efficiently [37], defining this motif as a new PAR binding module termed PBZ for PAR binding zinc finger. PBZ motifs display the consensus sequence [K/R]xxCx[F/Y]GxxCxbxxxxHxxx[F/Y]xH, and have only been identified in two additional mammalian proteins so far, the histone chaperone and DNA repair protein aprataxin and PNK-like factor (APLF), and the interstrand crosslink repair protein SNM1 (Figure 2b). Interestingly, in other

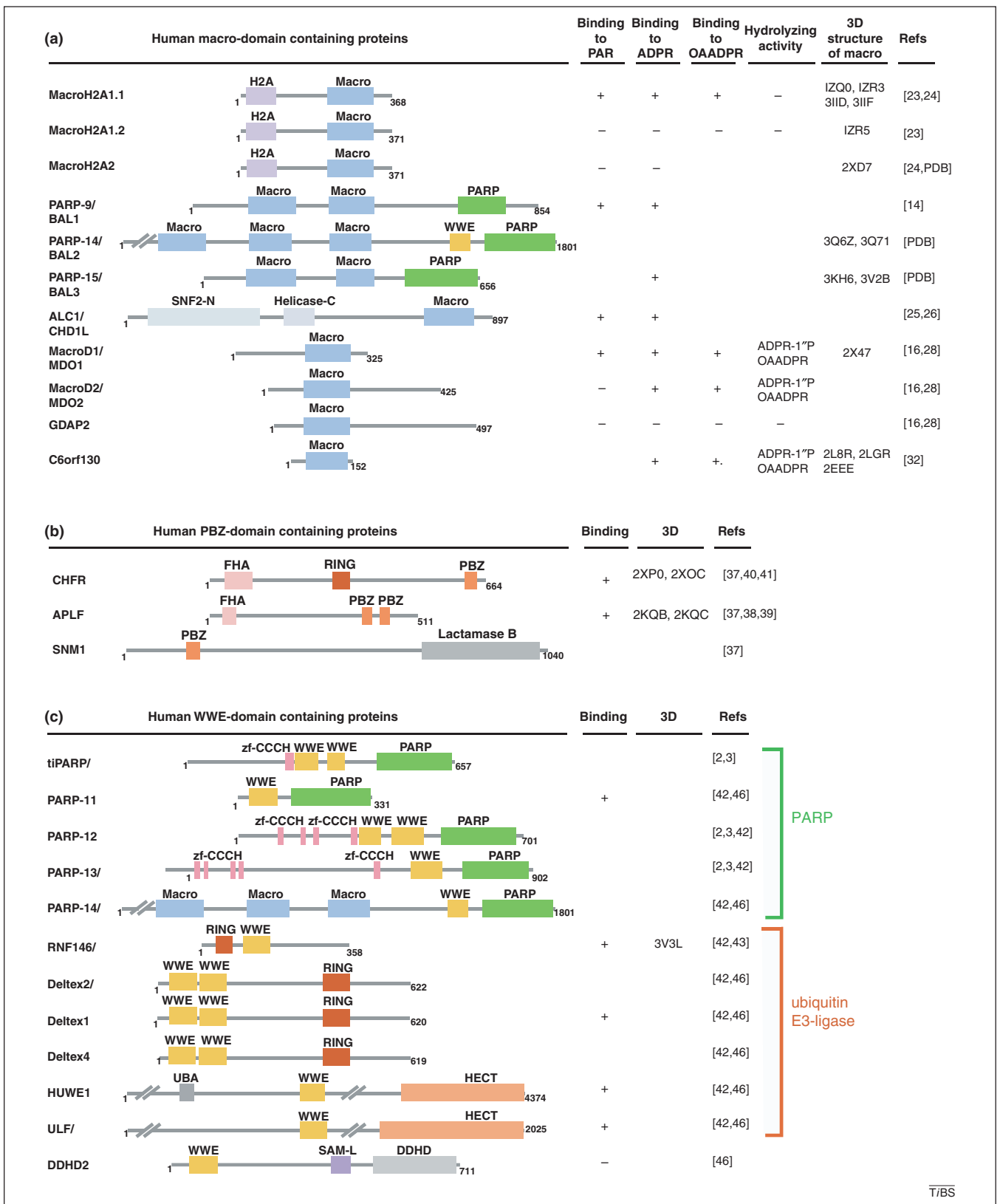


Figure 2. Schematic domain architecture of macro-, poly(ADP-ribose)-binding zinc finger (PBZ) and WWE domain containing human proteins. Protein domains illustrated by colored boxes are defined according to the Pfam 26.0 database. (a) Schematic representation of human macrodomain (blue box) containing proteins. Their ability to bind poly(ADP-ribose) (PAR), ADP-ribose (ADPR), or O-acetyl-ADP-ribose (OAADPR), and their hydrolyzing activity toward ADPR-1³²P or OAADPR is indicated, if known. Structural information, when available in the protein data bank (PDB), is indicated. (b) Schematic representation of human PBZ domain containing proteins. Their ability to bind PAR (if known), and the availability of their 3D structures, are indicated. (c) Schematic representation of human WWE domain containing proteins. These WWE-containing proteins are classified according to whether their associated domains are either endowed with poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) activity or with ubiquitin E3 ligase activity. Also indicated is whether these WWE domains possess the ability to bind PAR or isoADPR (if known), and whether 3D structural information is available. DDHD, Asp- and His-containing motif involved in phospholipase activity (light gray box); H2A, domain homologous to histone H2A (pale violet box); helicase-C, helicase

species, the PBZ domains are also found in proteins that are involved in the maintenance of genome integrity, and whose mammalian homologs are closely related to PAR metabolism. This is the case for the *Dictyostelium discoideum* tankyrase, chk2, and ku70; the *Caenorhabditis elegans* DNA ligase III; and the *Drosophila melanogaster* tdp1 [37]. Of note, some of the mammalian homologs (DNA ligase III, ku70) can bind PAR, but via a PBM instead of a PBZ motif [11]. Why different species have selected either a PBM or a PBZ for a protein homolog is an interesting issue, suggesting that there might be some redundant function between PBZ and PBM motifs.

The 3D structures of the APLF and CHFR PBZ motifs have been solved by nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy (APLF, CHFR) and crystallography (CHFR) [38–41]. The solution structure of the tandem PBZ modules of APLF shows that the two motifs termed F1 and F2 are structurally independent and thus could independently recognize ADPR and PAR [39]. However, tandem PBZ domains are over 1000 times more efficient in PAR binding than isolated PBZ domain. It is proposed that F1 may serve as the primary high-affinity anchoring site for PAR, and that the close proximity between the two zinc fingers generates synergy in PAR binding [39]. Using 2'-O- α -D-ribofuranosyladenosine, which is the simplest adenosine derivative to contain the characteristic $\alpha(1\rightarrow2)$ O-glycosidic bond between ribose rings, Eustermann and collaborators have showed by NMR that each PBZ module can recognize this internal fragment of PAR (Figure 1) [38]. The key residues designated by the solution structure to bind PAR have been confirmed by mutagenesis, because their substitution abolishes PAR binding *in vitro* and impairs recruitment of the PBZ mutants to laser-induced DNA damage sites [39].

By solving the crystal structure of the CHFR PBZ domain, bound to ligands structurally similar to different regions of PAR (ADPR, AMP, Figure 1) or to AMP2 (to mimic two successive adenosines of PAR), Oberoi and collaborators have identified two distinct adenine binding sites that allow the PBZ domain to recognize simultaneously two ADP-ribose units of PAR. The APLF PBZ F1 could have the same capacity, whereas APLF F2, which lacks one key residue, would bind only one adenine [41]. Collectively, these structural data demonstrate that, because of the internal recognition of PAR, PBZ motifs are *bona fide* PAR binding modules. This internal recognition of PAR is a property shared by the fourth PAR-binding domain recently structurally characterized, the WWE domain.

The most recently reported PAR domain: WWE

The WWE domain, named after its most conserved residues, was initially described as a single or duplicate motif found in proteins either related to PARylation or to

ubiquitylation (Figure 2c) [42]. The demonstration of a WWE domain binding to PAR was simultaneously reported for the RNF146 ubiquitin E3 ligase (also termed Iduna) in three different contexts: Wnt signaling, the DNA damage response, and neuroprotection [43–45]. It was very exciting to discover that PARylation is a prerequisite for RNF146 activity in these cellular processes, leading to poly-ubiquitylation and subsequent protein degradation by the proteasome (discussed later, and Figure 3). The RNF146 WWE domain binds the smallest PAR structural unit that contains the ribose–ribose glycosidic bond that is unique to PAR, named iso-ADPR [46] (Figure 1). The crystal structure of the RNF146 WWE domain in complex with iso-ADPR [46] has revealed, however, significant differences compared to the NMR structure of the RNF146 WWE domain alone (PDB 1UJR), suggesting that conformational changes occur upon binding. Such changes probably accommodate PAR binding through the recognition of the internal iso-ADPR [46], which is supported by the copurification of PAR polymers of varying length with RNF146 [43]. RNF146 can bind PAR, but not ADPR, supporting the idea that WWE domain cannot recognize mono-ADP-ribosylated proteins [46]. Therefore, in contrast to the macrodomain, which could play a role in the biology of both MARTs and PARPs, the WWE domain, like the PBZ domain, is probably involved only in biological processes relying on PARP activities. The next section highlights how both the WWE and PBZ PAR reader domains interpret this modification and convert it to a signal for protein elimination by the proteasome.

A new role for PAR: a label for subsequent ubiquitylation-mediated proteosomal degradation?

PARylation is a newcomer in the class of post-translational modifications that are known to mark proteins for elimination by the proteasome through the activation of the ubiquitylation process (Box 2). Several recently published concomitant studies have revealed the PAR-dependence of certain ubiquitin E3 ligases for targeting proteins for degradation. These E3 ligases bind PAR via either a WWE (RNF146/Iduna) [44,45,47] or a PBZ (CHFR) domain [48]. RNF146 poly-ubiquitylates automodified but not unmodified PARP-1 to target it for proteasomal degradation [44] (Figure 3a). RNF146 also ubiquitylates itself and poly-ubiquitylates many repair factors in a PAR-dependent manner, such as PARP-2, XRCC1, DNA ligase III, and ku70 [44]. Free PAR is sufficient to stimulate RNF146 activity, raising the possibility that the protein targeted for proteasomal degradation does not necessarily need to be PARylated itself [44]. RNF146 is rapidly recruited to laser-induced DNA-damaged sites; its PAR-dependent E3 ligase activity promotes DNA repair and prevents cell death induced by γ -irradiation, alkylating agents or hydrogen peroxide, but only at doses known to trigger cell death

superfamily C-terminal domain associated with DEXDc-, DEAD- and DEAH-box proteins (lavender box); FHA, forkhead associated (light pink box); HECT, homologous to E6-AP carboxyl terminus domain, displaying E3-ligase activity (light orange box); lactamase B, domain homologous to β -lactamase endowed with nuclease activity (gray box); macro, homologous to the nonhistone part of macroH2A, displaying PAR-binding activity (see text; blue box); PARP, catalytic domain, homologous to the poly(ADP-ribose) synthesis domain of PARP-1, endowed with mono- or poly(ADP-ribosylation) activity (green box); PBZ, PAR-binding zinc finger (see text; orange box); RING, really interesting new gene: zinc binding domain with ubiquitin E3 ligase activity (sienna box); SAM-L, sterile α motif-like (purple box); SNF2-N, SNF2 family N-terminal domain (light steel blue box); UBA, ubiquitin-binding domain (silver gray box); WWE, named after its three conserved residues Trp, Trp and Glu, displaying PAR-binding activity (see text; dark yellow box); Zf-CCCH, zinc finger motif (pink box).

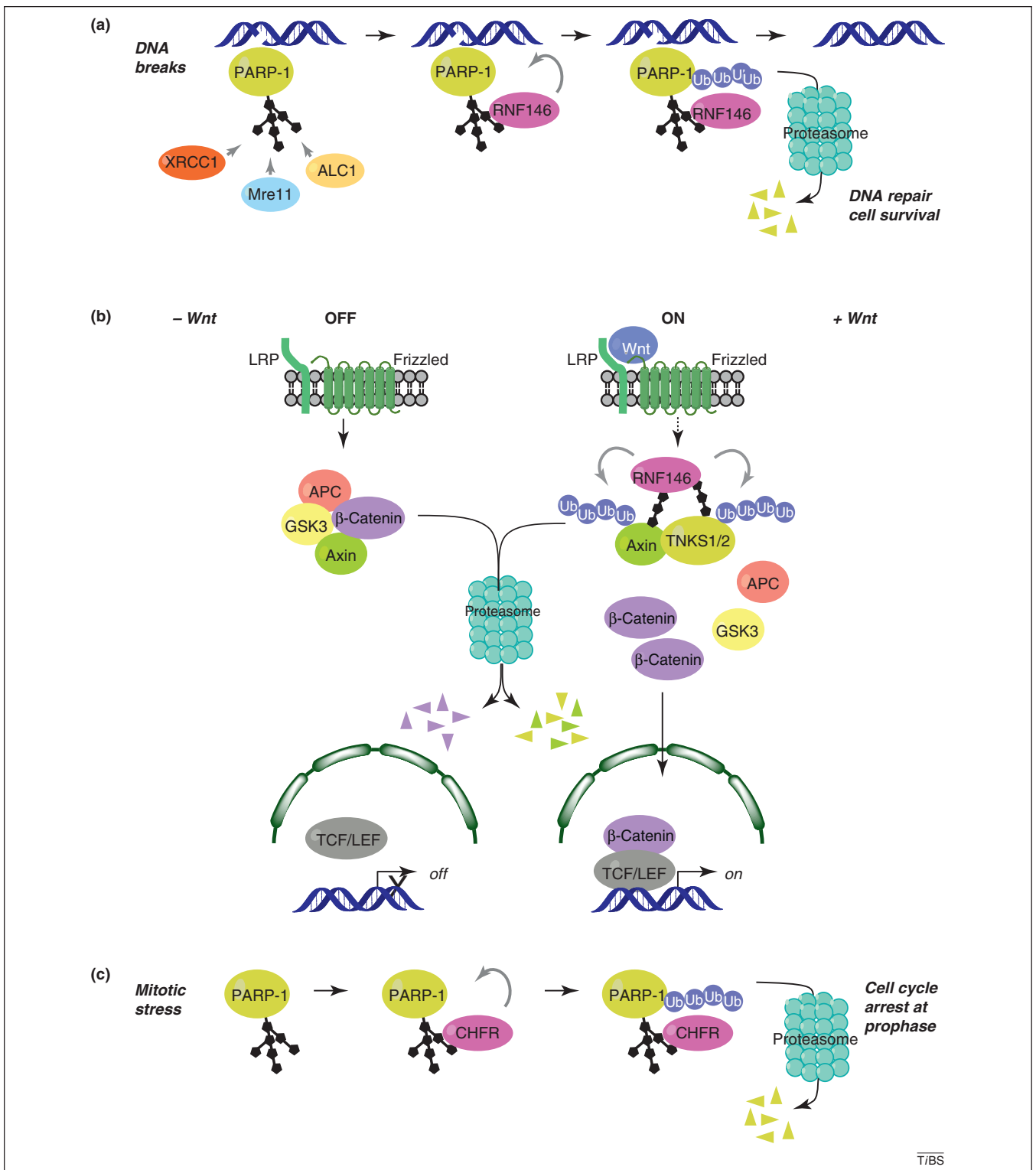


Figure 3. poly(ADP-ribose) (PAR)-dependent poly-ubiquitylation of proteins to promote their degradation by the proteasome. **(a)** PAR-dependent activation of RNF146 by poly(ADP-ribose) polymerase (PARP)-1 in the DNA damage response. PARP-1 detects DNA breaks, is activated, and auto- or heteromodifies acceptor proteins. PAR produced at DNA damage site has a signaling role and directly recruits factors involved in regulation of chromatin structure and DNA repair [for example amplified in liver cancer 1 (ALC1), X-ray repair cross-complementing gene 1 (XRCC1) or meiotic recombination 11 (Mre11), see Box 1]. The ubiquitin E3 ligase RNF146 is activated upon binding to poly(ADP-ribosyl)ated (PARylated) PARP-1 and poly-ubiquitylates PARP-1. Ubiquitylated PARP-1 is subsequently targeted to the proteasome for degradation. The timely and orchestrated poly(ADP-ribosyl)ation and ubiquitylation of PARP-1 regulates DNA repair and favors cell survival. **(b)** PAR-dependent activation of RNF146 by tankyrases during Wnt signaling. In the absence of Wnt, the multiprotein β -catenin destruction complex, which contains adenomatous polyposis coli (APC), glycogen synthase kinase 3 (GSK3) and axin triggers the proteasome-dependent degradation of β -catenin. The Wnt signaling cascade is activated by binding of Wnt to its receptor, the low-density lipoprotein receptor-related protein LRP/Frizzled. Tankyrase 1 and 2 (TNKS1/2) PARylate themselves and axin. How TNKS1/2 are activated during Wnt signaling is unknown, and it remains to be determined by which mechanism the activation signal is transmitted from Wnt receptor to TNKS1/2 (illustrated by a dashed arrow between the Wnt receptor and TNKS1/2/RNF146 complex). The PAR activates the ubiquitin E3 ligase RNF146, leading to TNKS1/2 and axin poly-ubiquitylation and subsequent degradation by the proteasome. The multiprotein β -catenin destruction complex is destabilized by the absence of axin, leading to β -catenin accumulation and

Box 2. Ubiquitylation-mediated protein degradation

Ubiquitin is a polypeptide of 76 amino acids that can be covalently transferred to a lysine residue of an acceptor protein in a post-translational process termed ubiquitylation [70]. Mono-ubiquitylation is involved in the regulation of protein function, whereas poly-ubiquitylation, in which ubiquitin molecules are sequentially transferred to form ubiquitin chains, is generally aimed to target proteins to degradation by the proteasome in a regulated manner. Ubiquitylation involves three classes of enzymes: an E1 enzyme activates ubiquitin and transfers it to an E2-conjugating enzyme; the E3-ubiquitin ligase enzyme then executes the transfer of ubiquitin to the protein substrate. It is the E3-enzyme that confers the specificity of the reaction by selecting the appropriate substrate [70].

in a PARP-1/PAR dependent manner [44]. Eviction of PARylated proteins from the damaged site for their subsequent degradation probably contributes to the spatiotemporal regulation of the repair machinery. In addition, removing PARylated PARP-1 from the site of DNA damage could prevent sustained PARP activity and thus protect against PAR-dependent cell death, which is called parthanatos [7]. In this type of caspase-independent programmed cell death, PAR promotes the release of AIF from the mitochondria and its translocation to the nucleus, to launch genomic DNA fragmentation; a process called chromatinolysis [7]. By limiting PAR accumulation and preventing parthanatos, RNF146 is thought to have a pro-survival role in the DNA damage response [44]. Similarly, RNF146 protects neurons after an excitotoxic stimulus [43]. In this study, transgenic mice overexpressing RNF146, or mice that have had lentiviruses encoding wild-type RNF146, but not a mutant RNF146 that cannot bind PAR, injected in the brain, showed protection toward N-methyl-D-aspartate (NMDA) excitotoxicity and brain infarction, confirming the PAR-dependent neuroprotective effect of RNF146 *in vivo* [43].

RNF146 activity can be regulated by other PARPs such as the tankyrases TNKS1 and TNKS2, during Wnt/ β -catenin signaling [45,47,49]. By promoting the RNF146-dependent degradation of the negative regulator axin, tankyrases can activate the Wnt/ β -catenin signaling pathway (Figure 3b). RNF146 WWE mutants that could not bind PAR also could not trigger axin degradation [45,47]. As observed for PARP-1, tankyrases themselves are subject to ubiquitylation and degradation during this process [45,47]. Tankyrase inhibitors thus appear as promising therapeutic drugs to antagonize constitutive activation of the Wnt cascade in Wnt-dependent cancers [49,50]. RNF146 is activated by PAR in different structures, such as the long and complex branched PAR generated by PARP-1 or the short and linear PAR generated by tankyrases, suggesting that many other PARPs could eventually modulate RNF146 to regulate the turnover of their substrate.

Besides axin, other targets of RNF146 that are regulated by tankyrase activity have been reported, such as the

basic leucine zipper nuclear factor 1 (BLZ1), which is involved in the maintenance of Golgi structure; and the cancer susceptibility candidate 3 (CASC3), which is implicated in post-splicing events [45]. Similar to axin, which binds the ankyrin-repeat domain of tankyrase, [51], BLZ1 and CASC3 possess a tankyrase-interacting domain, which allows tankyrase to identify them for PARylation and subsequent ubiquitylation by RNF146 [45]. Tankyrase and RNF146 use a similar mechanism to regulate the stability of c-Abl Src homology 3 domain-binding protein-2, also referred to as SH3BP2 or 3BP2, in osteoclasts [52]. Mutation in 3BP2 causes the autosomal-dominant syndrome cherubism, which is characterized by destructive inflammatory bone lesions resulting in facial deformities. Cherubism mutations prevent the TNKS/RNF146-mediated proteasomal destruction of 3BP2, leading to its stabilization and to increased osteoclastogenesis [52]. *Tnks*^{-/-}; *Tnks2*^{-/-} mice die *in utero* [53], but lineage specific *Tnks*-depletion by shRNA in *Tnks2*^{-/-} bone marrow cells phenocopied the knock-in cherubism mutation in *3BP2* gene, leading to bone loss and activation of osteoclasts [52]. The likely redundancy between TNKS1 and TNKS2, at least for this PAR-dependent ubiquitylation process, probably explains why knockout of a single tankyrase did not reveal a cherubism-like phenotype. In light of these new findings, the use of tankyrase inhibitors as a therapeutic strategy to target tumors with activated Wnt pathway as mentioned above should be cautiously examined, because sustained pharmacological inhibition of tankyrases might have unanticipated side effects such as osteoporosis, osteoclastogenesis and inflammation [52].

A functional link between PARP-1 auto-PARylation, subsequent poly-ubiquitylation, and proteasomal degradation has also been observed for a PBZ-containing ubiquitin E3 ligase, the CHFR mitotic checkpoint protein (Figure 3c) [48]. Mitotic stress induced by microtubule poisons such as nocodazole or docetaxel leads to PARP-1 automodification, poly-ubiquitylation by CHFR and degradation [48]. That the reduction in PARP-1 protein levels is required for cell cycle arrest at prophase is strengthened by the prolonged G2/M arrest observed in PARP-1-deficient cells treated with genotoxic drugs [54]. Conversely, PARP-1 activity might be required for proper downstream mitotic processes, as suggested by the presence of PARP-1 in mitotic centromeres and its interaction with and poly(ADP-ribosylation) of centromeric factors [55].

The close relation between PARylation and ubiquitylation to target proteins for degradation does not necessarily require the ubiquitin ligase to bind directly and/or be activated by PAR. For instance, the first target of TNKS to be discovered, the telomeric factor TRF1, is also degraded by ubiquitin-mediated proteolysis after release from telomeres upon PARylation by TNKS [56]. PARylation is required for TRF1 release from telomeres but is apparently dispensable for TRF1 proteasomal degradation [56], which is mediated by the SCFFbx4 E3 ligase [57]. However,

translocation into the nucleus, where it coactivates the T-cell factor/lymphoid enhancer (TCF/LEF) transcription factor, to promote transcription of Wnt-dependent genes. (c) PAR-dependent activation of CHFR [checkpoint with forkhead (FHA)-associated and really interesting new gene (RING) finger domains] by PARP-1 during mitotic stress. In response to mitotic stress caused by drugs that affect microtubules, such as nocodazole or docetaxel, PARP-1 is activated by an as-yet-unknown process, leading to its auto-PARylation. This results in the PAR-dependent activation of the ubiquitin E3 ligase CHFR and subsequent poly-ubiquitylation of PARP-1 and degradation by the proteasome. Removal of PARylated PARP-1 is necessary to promote cell cycle arrest at prophase.

SCFFbx4 has not been tested for direct PAR-binding or PAR-dependency for its catalytic activity. Another example is that in response to heat shock, PARP-1 is cleared from heat-shock-induced genes by sequential autoPARylation, sumoylation by the protein inhibitor of activated STAT-1 (signal transducer and activator of transcription-1) (PIAS1), and ubiquitination by the RING finger protein 4 (RNF4), leading to the subsequent degradation of PARP-1 [58]. Here again, there is currently no evidence that RNF4 catalytic activity depends on PAR.

It should be also emphasized that the link between PARylation and ubiquitylation-dependent protein degradation is not a general process: not every PARylated protein is led to degradation, and not every poly-ubiquitylated protein targeted to degradation requires prior PARylation. How this is sorted remains a major question. In addition, it is also possible that examples where PAR-dependent mono-ubiquitylation or poly-ubiquitylation does not result in protein degradation, but rather regulation of protein activities or localization, will arise in the future.

Concluding remarks

The recent structural characterization of new PAR-binding motifs, which brings the number of PAR readers that have their own specificity to four, has shed new light on the biological role of PAR and on how this molecule can be mechanistically decoded. Moreover, the discovery of a direct connection between PARylation and poly-ubiquitylation to target some proteins for degradation by the proteasome has opened the way for a new interpretation of the signaling function of PAR in several cellular processes: the degradation of proteins in a timely and orchestrated manner. However, in light of what has been discussed throughout this review, the major open question is: why is there a need for (at least) four different PAR-binding modules? It appears so far that PBM is probably a broad-spectrum PAR-binding domain that can regulate the many types of functional domains within which it can be inserted, whereas macro-, PBZ and WWE domains adopt specific structures that are probably associated with specific functions. This hypothesis is strengthened by the observation that macro-, PBZ and WWE domains do not recognize the same site within PAR (Figure 1), probably reflecting the different outcomes. However, both WWE and PBZ are involved in PAR-dependent ubiquitylation activity, thus defining a new family of PAR-dependent ubiquitin E3 ligases. As discussed in Box 1, all four types of PAR-binding domains could be involved in protein targeting to DNA-damage sites. This also raises the question of how can so many proteins endowed with PAR-binding domains and capable of binding free PAR, at least *in vitro*, discriminate between their PARylated protein targets (or even free PAR) *in vivo*? In light of this, a key point that needs further investigation is the structure of PAR itself. Although initial circular dichroism data have suggested that long PAR polymers adopt secondary structure [59], more recent NMR studies have indicated that free PAR is devoid of inherent regular structure [60]. It is tempting to speculate that, in physiological conditions, PAR might adopt the structural conformation that is favored by the physical

and chemical interactions with its bound protein target. Different conformations could be recognized by specific, conformation-dependent PAR-binding motifs that have not yet been discovered. Some PAR/protein interactions have already been shown to depend on PAR chain length, such as the nonhistone chromosomal oncoprotein DEK, which efficiently binds 54mer but not 18mer PAR [61], supporting the idea of a PAR-structure dependent binding [62]. Therefore, we anticipate the discovery of additional types of PAR-binding modules, owing to the wide diversity of PAR types produced in terms of size and complexity (linear or branched). Many characterized PAR-binding proteins display none of the already described PAR-binding modules, supporting this hypothesis. Furthermore, having now identified domains that specifically recognize the 2' → 1''-O-glycosidic bond that defines linear PAR molecules, one can envision that dedicated domains might exist to specifically recognize the 2'' → 1'''-O-glycosidic bond that defines branched PAR molecules.

Another intriguing question is how multiple PAR-binding motifs that are present within a single protein function together. Specifically, two macro-, PBZ or WWE domains have often been found within a single protein. PARP-14 even contains three macrodomains and one WWE domain, but the functionality of this WWE motif is unclear because some crucial residues for PAR recognition are not conserved [46]. The two PBZ domains of APLF, despite being in close proximity, are structurally independent [38]; however, the tandem APLF PBZ motifs also show synergy in PAR binding, suggesting a functional link between the two zinc fingers [39]. Structural modeling based on the structure of the unliganded *Drosophila* Deltex WWE domain suggests that two WWE domains could recognize two neighboring ADP-ribose units, supporting the idea of synergistic recognition of PAR by multiple PAR-binding domains present within a protein [46]. The next challenging issue is to determine whether a protein with multiple PAR-binding motifs could simultaneously bind different PARylated partners. This would multiply the possible mechanisms of tight regulation by functional interactions within protein complexes.

One final question is, what is the role of PARG in PARylation-coupled, ubiquitylation-mediated protein degradation, such as in the DNA damage response? The model described here, in which automodified PARP-1 is further ubiquitylated and rapidly degraded, does not take into account the efficient and quick PAR-degrading activity of PARG. Future experiments need to establish whether PARG, which is as essential as PARP-1 for prompt DNA breaks repair [63–65], is also involved in the PAR- and ubiquitin-dependent protein degradation process, or plays another PAR-dependent regulatory roles.

Acknowledgments

We apologize to investigators whose valuable contributions could not be cited in this review owing to space limitations. We thank the referees for their constructive suggestions. We acknowledge support from Centre National de la Recherche Scientifique, University of Strasbourg, Ligue contre le Cancer (comités du Bas-Rhin et du Haut-Rhin), Association pour la Recherche sur le Cancer, Agence Nationale de la Recherche, Electricité de France and Laboratory of Excellence Medalis. Our team is Equipe labellisée Ligue contre le Cancer.

References

- 1 Luo, X. and Kraus, W.L. (2012) On PAR with PARP: cellular stress signaling through poly(ADP-ribose) and PARP-1. *Genes Dev.* 26, 417–432
- 2 Hakmé, A. *et al.* (2008) The expanding field of poly(ADP-ribosylation) reactions. 'Protein Modifications: Beyond the Usual Suspects' Review Series. *EMBO Rep.* 9, 1094–1100
- 3 Hottiger, M.O. *et al.* (2010) Toward a unified nomenclature for mammalian ADP-ribosyltransferases. *Trends Biochem. Sci.* 35, 208–219
- 4 Rouleau, M. *et al.* (2010) PARP inhibition: PARP1 and beyond. *Nat. Rev.* 10, 293–301
- 5 Kleine, H. *et al.* (2008) Substrate-assisted catalysis by PARP10 limits its activity to mono-ADP-ribosylation. *Mol. Cell* 32, 57–69
- 6 Wang, Y. *et al.* (2011) Poly(ADP-ribose) (PAR) binding to apoptosis-inducing factor is critical for PAR polymerase-1-dependent cell death (parthanatos). *Sci. Signal.* 4, ra20
- 7 Wang, Y. *et al.* (2009) Poly(ADP-ribose) signals to mitochondrial AIF: a key event in parthanatos. *Exp. Neurol.* 218, 193–202
- 8 Helleday, T. (2011) The underlying mechanism for the PARP and BRCA synthetic lethality: clearing up the misunderstandings. *Mol. Oncol.* 5, 387–393
- 9 Javle, M. and Curtin, N.J. (2011) The role of PARP in DNA repair and its therapeutic exploitation. *Br. J. Cancer* 105, 1114–1122
- 10 Garnett, M.J. *et al.* (2012) Systematic identification of genomic markers of drug sensitivity in cancer cells. *Nature* 483, 509–642
- 11 Pleschke, J.M. *et al.* (2000) Poly(ADP-ribose) binds to specific domains in DNA damage checkpoint proteins. *J. Biol. Chem.* 275, 40974–40980
- 12 Gagné, J.P. *et al.* (2008) Proteome-wide identification of poly(ADP-ribose) binding proteins and poly(ADP-ribose)-associated protein complexes. *Nucleic Acids Res.* 36, 6959–6976
- 13 Pehrson, J.R. and Fried, V.A. (1992) MacroH2A, a core histone containing a large nonhistone region. *Science* 257, 1398–1400
- 14 Karras, G.I. *et al.* (2005) The macro domain is an ADP-ribose binding module. *EMBO J.* 24, 1911–1920
- 15 Slade, D. *et al.* (2011) The structure and catalytic mechanism of a poly(ADP-ribose) glycohydrolase. *Nature* 477, 616–620
- 16 Chen, D. *et al.* (2011) Identification of macrodomain proteins as novel O-acetyl-ADP-ribose deacetylases. *J. Biol. Chem.* 286, 13261–13271
- 17 Kleine, H. and Luscher, B. (2009) Learning how to read ADP-ribosylation. *Cell* 139, 17–19
- 18 Han, W. *et al.* (2011) The macro domain protein family: structure, functions, and their potential therapeutic implications. *Mutat. Res.* 727, 86–103
- 19 Aguiar, R.C. *et al.* (2005) B-aggressive lymphoma (BAL) family proteins have unique domains that modulate transcription and exhibit Poly(ADP-ribose) polymerase activity. *J. Biol. Chem.* 280, 33756–33765
- 20 Goenka, S. and Boothby, M. (2006) Selective potentiation of Stat-dependent gene expression by collaborator of Stat6 (CoaSt6), a transcriptional cofactor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103, 4210–4215
- 21 Mehrotra, P. *et al.* (2011) PARP-14 functions as a transcriptional switch for STAT6 dependent gene activation. *J. Biol. Chem.* 286, 1767–1776
- 22 Till, S. and Ladurner, A.G. (2009) Sensing NAD metabolites through macro domains. *Front. Biosci.* 14, 3246–3258
- 23 Kustatscher, G. *et al.* (2005) Splicing regulates NAD metabolite binding to histone macroH2A. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 12, 624–625
- 24 Timinszky, G. *et al.* (2009) A macrodomain-containing histone rearranges chromatin upon sensing PARP1 activation. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 16, 923–929
- 25 Gottschalk, A.J. *et al.* (2009) Poly(ADP-ribosylation) directs recruitment and activation of an ATP-dependent chromatin remodeler. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106, 13770–13774
- 26 Ahel, D. *et al.* (2009) Poly(ADP-ribose)-dependent regulation of DNA repair by the chromatin remodeling enzyme ALC1. *Science* 325, 1240–1243
- 27 Eglhoff, M.P. *et al.* (2006) Structural and functional basis for ADP-ribose and poly(ADP-ribose) binding by viral macro domains. *J. Virol.* 80, 8493–8502
- 28 Neuvonen, M. and Ahola, T. (2009) Differential activities of cellular and viral macro domain proteins in binding of ADP-ribose metabolites. *J. Mol. Biol.* 385, 212–225
- 29 Malet, H. *et al.* (2009) The crystal structures of Chikungunya and Venezuelan equine encephalitis virus nsP3 macro domains define a conserved adenosine binding pocket. *J. Virol.* 83, 6534–6545
- 30 Dani, N. *et al.* (2009) Combining affinity purification by ADP-ribose-binding macro domains with mass spectrometry to define the mammalian ADP-ribosyl proteome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106, 4243–4248
- 31 Guetg, C. *et al.* (2012) Inheritance of silent rDNA chromatin is mediated by PARP1 via noncoding RNA. *Mol. Cell* 45, 790–800
- 32 Peterson, F.C. *et al.* (2011) Orphan macrodomain protein (human C6orf130) is an O-acyl-ADP-ribose deacylase: solution structure and catalytic properties. *J. Biol. Chem.* 286, 35955–35965
- 33 Hassler, M. *et al.* (2011) PARG: a macrodomain in disguise. *Structure* 19, 1351–1353
- 34 Brochu, G. *et al.* (1994) Mode of action of poly(ADP-ribose) glycohydrolase. *Biochim. Biophys. Acta* 1219, 342–350
- 35 Kim, I.K. *et al.* (2012) Structure of mammalian poly(ADP-ribose) glycohydrolase reveals a flexible tyrosine clasp as a substrate-binding element. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 19, 653–656
- 36 Scolnick, D.M. and Halazonetis, T.D. (2000) Chfr defines a mitotic stress checkpoint that delays entry into metaphase. *Nature* 406, 430–435
- 37 Ahel, I. *et al.* (2008) Poly(ADP-ribose)-binding zinc finger motifs in DNA repair/checkpoint proteins. *Nature* 451, 81–85
- 38 Eustermann, S. *et al.* (2010) Solution structures of the two PBZ domains from human APLF and their interaction with poly(ADP-ribose). *Nat. Struct. Mol. Biol.* 17, 241–243
- 39 Li, G.Y. *et al.* (2010) Structure and identification of ADP-ribose recognition motifs of APLF and role in the DNA damage response. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 107, 9129–9134
- 40 Isogai, S. *et al.* (2010) Solution structure of a zinc-finger domain that binds to poly-ADP-ribose. *Genes Cells* 15, 101–110
- 41 Oberoi, J. *et al.* (2010) Structural basis of poly(ADP-ribose) recognition by the multizinc binding domain of checkpoint with forkhead-associated and RING domains (CHFR). *J. Biol. Chem.* 285, 39348–39358
- 42 Aravind, L. (2001) The WWE domain: a common interaction module in protein ubiquitination and ADP ribosylation. *Trends Biochem. Sci.* 26, 273–275
- 43 Andrabi, S.A. *et al.* (2011) Iduna protects the brain from glutamate excitotoxicity and stroke by interfering with poly(ADP-ribose) polymer-induced cell death. *Nat. Med.* 17, 692–699
- 44 Kang, H.C. *et al.* (2011) Iduna is a poly(ADP-ribose) (PAR)-dependent E3 ubiquitin ligase that regulates DNA damage. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 108, 14103–14108
- 45 Zhang, Y. *et al.* (2011) RNF146 is a poly(ADP-ribose)-directed E3 ligase that regulates axin degradation and Wnt signalling. *Nat. Cell Biol.* 13, 623–629
- 46 Wang, Z. *et al.* (2012) Recognition of the iso-ADP-ribose moiety in poly(ADP-ribose) by WWE domains suggests a general mechanism for poly(ADP-ribosylation)-dependent ubiquitination. *Genes Dev.* 26, 235–240
- 47 Callow, M.G. *et al.* (2011) Ubiquitin ligase RNF146 regulates tankyrase and axin to promote Wnt signaling. *PLoS ONE* 6, e22595
- 48 Kashima, L. *et al.* (2012) CHFR regulates the mitotic checkpoint by targeting PARP-1 for ubiquitination and degradation. *J. Biol. Chem.* 287, 12975–12984
- 49 Huang, S.M. *et al.* (2009) Tankyrase inhibition stabilizes axin and antagonizes Wnt signalling. *Nature* 461, 614–620
- 50 Waaler, J. *et al.* (2012) A novel tankyrase inhibitor decreases canonical Wnt signaling in colon carcinoma cells and reduces tumor growth in conditional APC mutant mice. *Cancer Res.* 72, 2822–2832
- 51 Morrone, S. *et al.* (2012) Crystal structure of a Tankyrase–Axin complex and its implications for Axin turnover and Tankyrase substrate recruitment. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 109, 1500–1505
- 52 Levaot, N. *et al.* (2011) Loss of Tankyrase-mediated destruction of 3BP2 is the underlying pathogenic mechanism of cherubism. *Cell* 147, 1324–1339
- 53 Chiang, Y.J. *et al.* (2008) Tankyrase 1 and tankyrase 2 are essential but redundant for mouse embryonic development. *PLoS ONE* 3, e2639
- 54 Menissier de Murcia, J. *et al.* (1997) Requirement of poly(ADP-ribose) polymerase in recovery from DNA damage in mice and in cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94, 7303–7307
- 55 Saxena, A. *et al.* (2002) Centromere proteins Cenpa, Cenpb, and Bub3 interact with poly(ADP-ribose) polymerase-1 protein and are poly(ADP-ribosyl)ated. *J. Biol. Chem.* 277, 26921–26926

- 56 Chang, W. *et al.* (2003) TRF1 is degraded by ubiquitin-mediated proteolysis after release from telomeres. *Genes Dev.* 17, 1328–1333
- 57 Zeng, Z. *et al.* (2010) Structural basis of selective ubiquitination of TRF1 by SCFFbx4. *Dev. Cell* 18, 214–225
- 58 Martin, N. *et al.* (2009) PARP-1 transcriptional activity is regulated by sumoylation upon heat shock. *EMBO J.* 28, 3534–3548
- 59 Minaga, T. and Kun, E. (1983) Probable helical conformation of poly(ADP-ribose). The effect of cations on spectral properties. *J. Biol. Chem.* 258, 5726–5730
- 60 Schultheisz, H.L. *et al.* (2009) Enzymatic synthesis and structural characterization of 13C, 15N-poly(ADP-ribose). *J. Am. Chem. Soc.* 131, 14571–14578
- 61 Fahrner, J. *et al.* (2010) High-affinity interaction of poly(ADP-ribose) and the human DEK oncoprotein depends upon chain length. *Biochemistry* 49, 7119–7130
- 62 Fahrner, J. *et al.* (2007) Quantitative analysis of the binding affinity of poly(ADP-ribose) to specific binding proteins as a function of chain length. *Nucleic Acids Res.* 35, e143
- 63 Fisher, A.E. *et al.* (2007) Poly(ADP-ribose) polymerase 1 accelerates single-strand break repair in concert with poly(ADP-ribose) glycohydrolase. *Mol. Cell. Biol.* 27, 5597–5605
- 64 Amé, J.C. *et al.* (2009) Radiation-induced mitotic catastrophe in PARG-deficient cells. *J. Cell Sci.* 122, 1990–2002
- 65 Erdelyi, K. *et al.* (2009) Dual role of poly(ADP-ribose) glycohydrolase in the regulation of cell death in oxidatively stressed A549 cells. *FASEB J.* 23, 3553–3563
- 66 de Vos, M. *et al.* (2012) The diverse roles and clinical relevance of PARPs in DNA damage repair: current state of the art. *Biochem. Pharmacol.* 84, 137–146
- 67 Krishnakumar, R. and Kraus, W.L. (2010) The PARP side of the nucleus: molecular actions, physiological outcomes, and clinical targets. *Mol. Cell* 39, 8–24
- 68 Chou, D.M. *et al.* (2010) A chromatin localization screen reveals poly(ADP-ribose)-regulated recruitment of the repressive polycomb and NuRD complexes to sites of DNA damage. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 107, 18475–18480
- 69 Ismail, I.H. *et al.* (2012) CBX4-mediated SUMO modification regulates BMI1 recruitment at sites of DNA damage. *Nucleic Acids Res.* <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gks222>
- 70 Weissman, A.M. *et al.* (2011) The predator becomes the prey: regulating the ubiquitin system by ubiquitylation and degradation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 12, 605–620

5.1. Le motif d'interaction au PAR (PAR binding motif)

C'est le premier motif d'interaction au poly(ADP-ribose) qui a été décrit, il est composé d'une dizaine d'acides aminés dont la séquence consensus récemment affinée est la suivante : [HKR]1-X2-X3-[AIQVY]4-[KR]5-[KR]6-[AILV]7-[FILPV]8 où X désigne n'importe quel acide aminé (Gagne et al., 2008; Pleschke et al., 2000). Ce motif a été majoritairement détecté dans des protéines liées à la structure de la chromatine (H1, H2A, H2B, SMARCA5, ...) et à la réparation de l'ADN (XRCC1, Ku70, ADN ligase III, XPA, ...) ou d'autres encore impliquées dans la mort cellulaire (p53, p21, AIF).

Dans la plupart des cas, l'interaction au polymère permet une relocalisation des protéines, c'est le cas de la protéine AIF qui est relocalisée de la mitochondrie vers le noyau lors de l'apoptose caspase-indépendante modulée par PARP-1 ou de XRCC1 (X-ray Repair Cross-Complementing protein 1) qui est recrutée sur les lieux de cassures simple-brin de l'ADN (El-Khamisy et al., 2003; Yu et al., 2002).

5.2. Le domaine macro

Le domaine macro est composé d'environ 190 acides aminés et a été décrit pour la première fois dans le variant d'histone macroH2A (Pehrson and Fried, 1992). Depuis, les structures tridimensionnelles du domaine macro de protéines humaines en complexe avec l'ADP-ribose ont permis d'étudier leur mode d'interaction (Karras et al., 2005; Timinszky et al., 2009). Il s'agit d'un domaine globulaire mixte composé de feuillets β et d'hélices α qui lie le PAR/ADP-ribose dans une poche hydrophobe bloquant l'accès aux groupements hydroxyles 2' et 3' du ribose proximal. En d'autres termes, seul l'ADP-ribose libre ou en position terminale du PAR peuvent être liés (**figure 5**). Parmi les protéines humaines à domaine macro on retrouve des variants d'histones (macroH2A1.1, macroH2A1.2 et macroH2A2), des PARPs (PARP-9, PARP-14 et PARP-15) ou encore l'hélicase ALC1.

Il a été montré récemment que ce domaine est porteur d'une activité catalytique : la mono(ADP-ribose) hydrolyse permettant de séparer le résidu ADP-ribose de l'acide aminé auquel il est covalamment lié. Cette activité ne concerne pas toutes les macro-protéines mais seulement macroD1, macroD2 et C6orf130 chez l'homme (Barkauskaite et al., 2013; Jankevicius et al., 2013).

5.3. Le domaine PBZ

Ce troisième domaine de liaison au PAR a été découvert dans la protéine APLF (Aprataxin and PNK-Like Factor) impliquée dans la réparation des dommages à l'ADN et dans la protéine CHFR (Checkpoint with Forkhead (FHA)-associated and Really interesting new gene (RING) finger domain) qui contrôle le cycle cellulaire (Ahel et al., 2008; Oberoi et al., 2010). Il consiste en un doigt de zinc de type C2H2 et de séquence consensus [K/R]xxCx[F/ Y]GxxCxbbxxxxHxxx[F/Y]xH (avec K : lysine ; R : arginine ; C : cystéine ; G : glycine ; H : histidine ; F : phénylalanine ; Y : tyrosine ; x : n'importe quel acide aminé ; b : acide aminé basique). Des structures tridimensionnelles du domaine PBZ en complexe avec le PAR ont été obtenues en RMN (Résonance Magnétique Nucléaire) et elles montrent que la liaison au zinc est nécessaire à l'interaction au PAR. De plus, le domaine PBZ peut accommoder 2 adénine adjacentes ainsi que la liaison diphosphate ce qui lui permettrait de reconnaître le PAR au niveau interne, au contraire du domaine macro (**figure 5**). Enfin, il est intéressant de remarquer qu'un motif généralement impliqué dans la liaison à l'ADN ou l'ARN puisse également interagir avec le PAR. Ceci démontre à nouveau la forte ressemblance entre le PAR et les autres acides nucléiques.

5.4. Le domaine WWE

C'est le dernier domaine de liaison au PAR qui a été caractérisé. Il est présent dans de nombreuses PARPs (tiPARP, PARP-11, PARP-12, PARP-13 et PARP-14) et ubiquitine-E3 ligases (RNF-146, Deltex1, Deltex4). Il a été dénommé ainsi en raison de la conservation de ces 2 acides aminés (W : tryptophane ; E : acide glutamique). Le domaine WWE reconnaît lui aussi le PAR au niveau interne (unité iso-ADP-ribose) mais pas l'ADP-ribose seul (**figure 5**). Les études récentes ont montré l'existence d'une ubiquitylation PAR-dépendante via l'activation d'enzymes E3-ligases induite par leur liaison au PAR (Kang et al., 2011; Wang et al., 2012; Zhang et al., 2011).

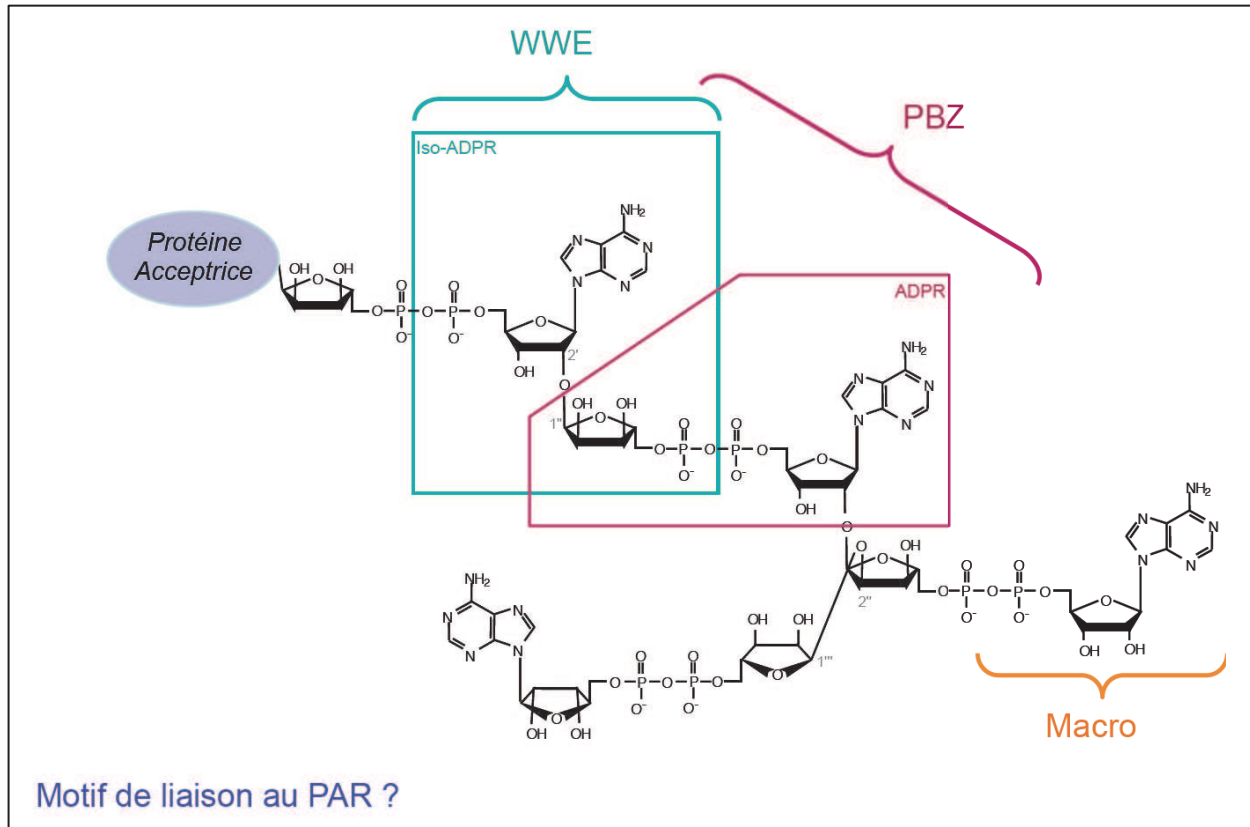


Figure 5 : les domaines de liaison au PAR

Les différents domaines de liaison et leur mode d'interaction au PAR sont illustrés sur ce schéma du poly(ADP-ribose) (WWE : domaine WWE ; PBZ : PAR-Binding Zinc finger ; macro : domaine macro). Seul le mode de reconnaissance du motif de liaison au PAR n'est pas encore déterminé. ADPR : ADP-ribose. Figure adaptée de (Kalisch et al., 2012).

En conclusion, le PAR peut moduler la fonction d'un nombre important de protéines intervenant majoritairement dans des processus relatifs à l'organisation et la maintenance de l'intégrité du génome, l'expression génique mais aussi la division ou la survie cellulaires. Le fait que la famille PARP soit composée de 17 membres augmente d'autant plus le rayon d'action de cette modification post-traductionnelle dans la cellule, comme nous allons le voir dans le chapitre suivant.

II. La famille PARP

La famille PARP comporte 17 membres caractérisés par la conservation du domaine catalytique possédant l'activité ADP-ribose transférase. La protéine PARP-1 est le membre fondateur du groupe et c'est, basé sur la séquence de son gène, que les membres paralogues ont été découverts (Ame et al., 2004). Ce domaine PARP est caractérisé par un repliement de type β - α -loop- β - α NAD⁺ qui est capable de lier le NAD⁺. Cependant, ce domaine présente des variations entre les 17 membres du groupe, et de fait tous ne sont pas capables de synthétiser le PAR (**Figure 6**). De plus, la famille est caractérisée par une forte hétérogénéité puisque le domaine PARP est souvent accompagné de domaines différents impliqués dans la liaison aux acides nucléiques ou aux protéines (Schreiber et al., 2006).

Nous classons donc les membres de la famille PARP en fonction de leur activité catalytique ou des domaines/fonctions associés au domaine PARP.

1. Classification des membres de la famille PARP

Comme nous l'avons vu précédemment, les 17 membres de la famille PARP possèdent le domaine PARP en commun. Néanmoins, des variations subtiles entraînent dans certains cas une réduction voire une perte totale d'activité catalytique. Une première classification tient donc compte de ces disparités. En fait, il a été montré que l'activité catalytique de PARP-1 est portée essentiellement par 3 acides aminés formant une triade catalytique : H-Y-E (histidine-tyrosine-glutamate) (Kleine et al., 2008). Cette triade permet d'intégrer les PARPs à la famille des ARTDs (Diphtheria toxin-like ADP-RibosylTransférases), elles sont donc homologues à la toxine diphtérique qui est une mono(ADP-ribose) transférase bactérienne (Hottiger et al., 2010). Il se trouve que le résidu glutamate est requis pour l'activité d'élongation, or ce résidu n'est retrouvé que dans PARP-1 (E988), PARP-2, PARP-3, PARP-4 (v-PARP) et PARP-5a et -5b (tankyrases 1 et 2). Tous les autres membres de la famille sont donc au mieux des mono(ADP-ribose) transférases ou sinon carrément inactives (**tableau 1**) (Gibson and Kraus, 2012). En ce qui concerne les PARP-6-8, 10-12 et 14-16, le glutamate est remplacé respectivement par une isoleucine (I), une leucine (L) ou une tyrosine (Y), suggérant une activité de mono(ADP-ribose) transférase uniquement. Cette activité a été effectivement démontrée pour PARP-10, PARP-14 ou encore PARP-15 (Aguiar et al., 2005; Kleine et al., 2008). Ainsi, au vu de ces disparités, le terme

PARP peut paraître abusif. C’est pourquoi cette nomenclature propose le nom ARTD et permet de classer les enzymes en fonction de leur activité et de leurs similarités structurales. Enfin, PARP-9 (Q-Y-T) et PARP-13 (Y-Y-V), qui n’ont conservé que la tyrosine centrale de la triade H-Y-E, sont inactives certainement parce qu’elles ne peuvent plus ni fixer le NAD⁺ ni catalyser le transfert d’ADP-ribose (Aguilar et al., 2005; Kleine et al., 2008; Ruf et al., 1996).

Nom PARP	Nom alternatif	Nom transférase	Sous-classe	Triade	Activité enzymatique	Domaines
PARP-1		ARTD1	ADN-dép.	H-Y-E	Poly	WGR, BRCT, Zn
PARP-2		ARTD2	ADN-dép.	H-Y-E	Poly	WGR
PARP-3		ARTD3	ADN-dép.	H-Y-E	Poly	WGR
PARP-4	vPARP	ARTD4		H-Y-E	<i>Poly</i>	BRCT, vWA
PARP-5a	Tankyrase 1	ARTD5	Tankyrase	H-Y-E	Poly	Répétition ankyrine
PARP-5b	Tankyrase 2	ARTD6	Tankyrase	H-Y-E	Poly	Répétition ankyrine
PARP-6		ARTD17		H-Y-Y	<i>Mono</i>	
PARP-7	Ti-PARP	ARTD14	CCCH-PARP	H-Y-I	Mono	Zn, WWE
PARP-8		ARTD16		H-Y-I	<i>Mono</i>	
PARP-9	BAL1	ARTD9	Macro-PARP	Q-Y-T	Inactive	Macro
PARP-10		ARTD10		H-Y-I	Mono	UIM, RRM
PARP-11		ARTD11		H-Y-I	<i>Mono</i>	WWE
PARP-12		ARTD12	CCCH-PARP	H-Y-I	<i>Mono</i>	Zn, WWE
PARP-13		ARTD13	CCCH-PARP	H-Y-V	Inactive	Zn, WWE
PARP-14	BAL2	ARTD8	Macro-PARP	H-Y-L	Mono	Macro, WWE
PARP-15	BAL3	ARTD7	Macro-PARP	H-Y-L	Mono	Macro
PARP-16		ARTD15		H-Y-I	Mono	

Tableau 1 : classification de la famille PARP en fonction de l'activité catalytique

Dans ce tableau sont classées les 17 membres de la famille PARP en fonction de leur nom initial (ordre croissant de PARP-1 à PARP-16). Néanmoins, certaines possèdent un nom alternatif qui est ici mentionné, de plus les noms correspondant à la nouvelle nomenclature ARTD sont notés. Les sous-classes correspondantes et les domaines associés au domaine catalytique PARP sont également indiqués. Enfin, en fonction de la triade catalytique, les PARPs sont classées selon leur activité enzymatique : poly(ADP-ribose) polymérase en orange, mono(ADP-ribose) transférase en vert. Lorsque l’activité n’a pas encore été décrite expérimentalement, elle est indiquée en italique. Les PARPs inactives sont colorées en bleu. WGR (résidus conservés tryptophane-glycine-arginine), BRCT (BRCA1-Cterminus), Zn (Zinc-finger), vWA (von Willebrand factor type A), UIM (ubiquitin interacting motif), RRM (RNA recognition motif), WWE (résidus conservés tryptophanes-glutamate).

Une seconde classification des PARPs consiste à regrouper les membres partageant un domaine ou une fonction semblables. Ainsi, nous pouvons définir 4 groupes : les PARPs ADN-dépendantes (PARP-1, PARP-2 et PARP-3), les tankyrases (PARP-5a et b), les CCCH-PARPs (TiPARP, PARP-12 et PARP-13) et les macro-PARPs (PARP-9, PARP-14 et PARP-15) (Schreiber et al., 2006). Les PARPs restantes ne peuvent être classées selon le modèle utilisé (**figure 6**).

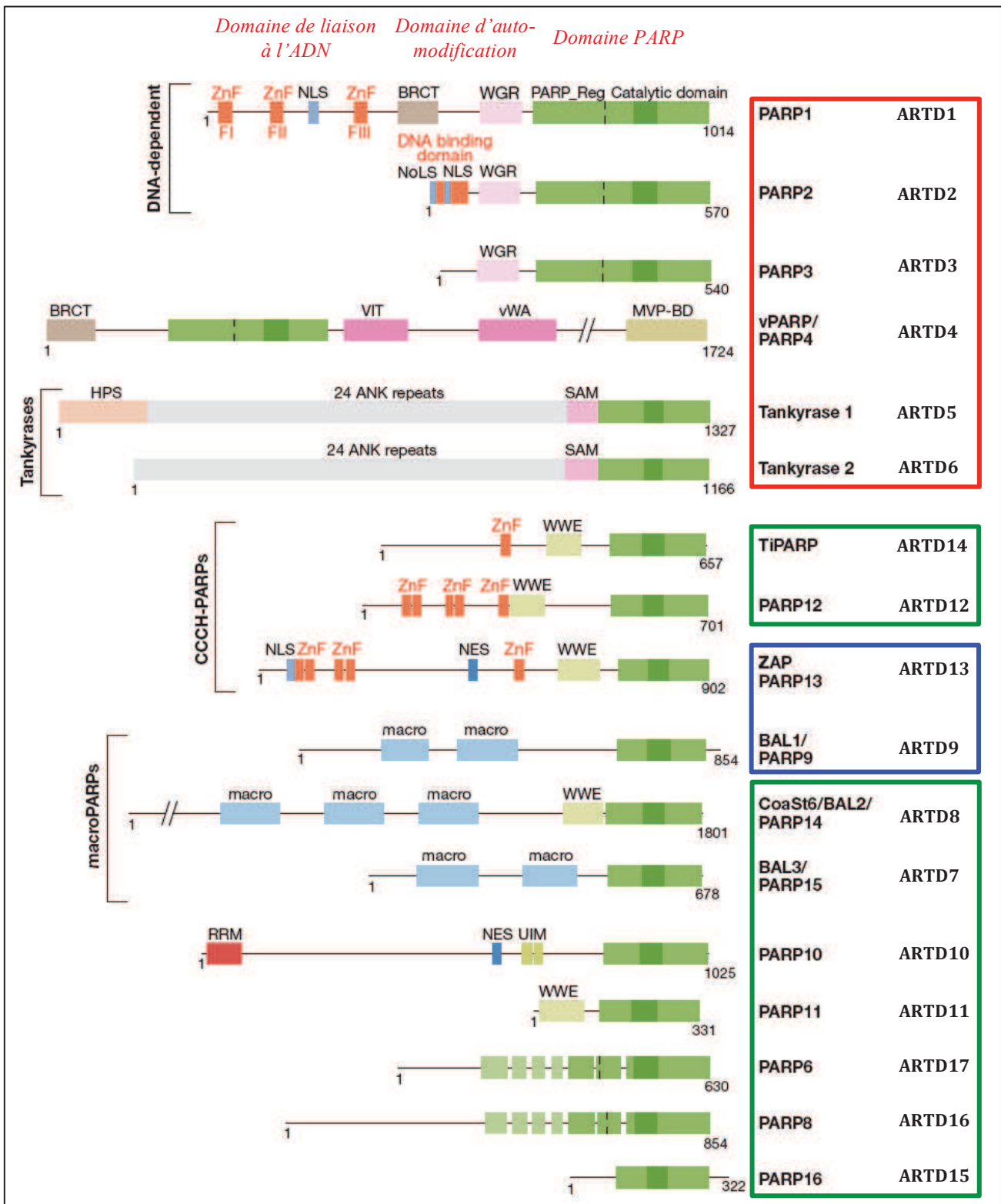


Figure 6 : la classification de la famille PARP en fonction des domaines associés

La signature PARP comportant la triade catalytique est représentée en vert foncé, le rectangle vert clair correspondant au domaine PARP. Les domaines BRCT (BRCA1-C-Terminus), SAM (Steril Alpha-Motif), UIM (Ubiquitin Interacting Motif), MVP-BD (MVP BinDing), vWA (von Willebrand factor type A) et ANK (ANKirin) sont des domaines d'interaction protéine-protéine. Les autres domaines contenus dans les PARPs sont HPS (répétitions histidine, proline et sérine), NES (Nuclear Export Signal), NLS (Nuclear Localization Signal), NoLS (Nucleolar Localization Signal), RRM (RNA Recognition Motif), VIT (Vault Inter α -Trypsin), WGR (résidus conservés tryptophane, glycine et arginine), ZnF (ZincFinger). Enfin, certaines PARPs possèdent des domaines d'interaction au PAR macro et WWE. Les noms des PARPs sont encadrés en rouge, vert ou bleu selon qu'elles sont respectivement des PARPs, des MARTs ou inactives. Figure adaptée de (Hakme et al., 2008b).

2. Les PARPs ADN-dépendantes

L'activité catalytique de certaines PARPs est stimulée par des cassures dans l'ADN : PARP-1, PARP-2 et PARP-3.

2.1. PARP-1/ARTD1

PARP-1 est le membre fondateur de la famille PARP, et à ce titre, elle reste encore aujourd'hui l'objet principal des recherches menées dans ce domaine. C'est une protéine de 1014 acides aminés et 113 kDa qui est localisée dans le noyau et le nucléole des cellules et qui est responsable de $\approx 90\%$ de l'activité de poly(ADP-ribosyl)ation totale (Ame et al., 1999). Elle comporte de multiples domaines associés au domaine catalytique PARP. En fait, nous pouvons subdiviser la protéine en trois parties : le domaine de liaison à l'ADN en N-terminal, le domaine central d'automodification et le domaine catalytique en C-terminal (**figures 6 et 7**). Cette structure modulaire tripartite permet à la protéine de coordonner facilement son activité catalytique et sa liaison aux acides nucléiques tout en s'autorégulant via l'automodification du domaine central (Zahradka and Ebisuzaki, 1982). En effet, l'automodification induit le décrochage de l'ADN et l'inactivation de l'activité enzymatique.

Le domaine de liaison à l'ADN comporte 2 doigts de zinc notés Zn1 et Zn2, et un domaine de liaison au zinc nommé ZBD qui permettent à PARP-1 d'interagir avec diverses structures d'ADN. Les doigts de zinc Zn1 et Zn2 sont de type CCHC (Cys-X₂-Cys-X₂₈₋₃₀-H-X₂-Cys) et sont différemment impliqués dans la liaison à l'ADN (Ali et al., 2012; Langelier et al., 2011). En effet, Zn1 préfère les cassures doubles brins de l'ADN ou DSBs (Double-Strand Breaks) tandis que Zn2 interagit plus fortement avec les ADN comportant des coupures (nicks) ou des interruptions (gaps). En revanche, ils interagissent de concert avec le nucléosome (Clark et al., 2012). Le doigt de zinc ZBD qui lie également les DSBs est de type CCCC (Cys-X₂-Cys-X₁₁₋₁₂-Cys-X₉-Cys). Il est responsable de la coordination entre la liaison à l'ADN et l'activité enzymatique de PARP-1 ou encore de la compaction de l'ADN (Langelier et al., 2010; Langelier et al., 2008). Cette région N-terminale contient également un signal de localisation nucléaire (NLS) caractérisé par la présence d'un site de clivage ciblée par la caspase 3 lors du processus apoptotique (D214) (Lazebnik et al., 1994; Oliver et al., 1998; Schreiber et al., 1992).

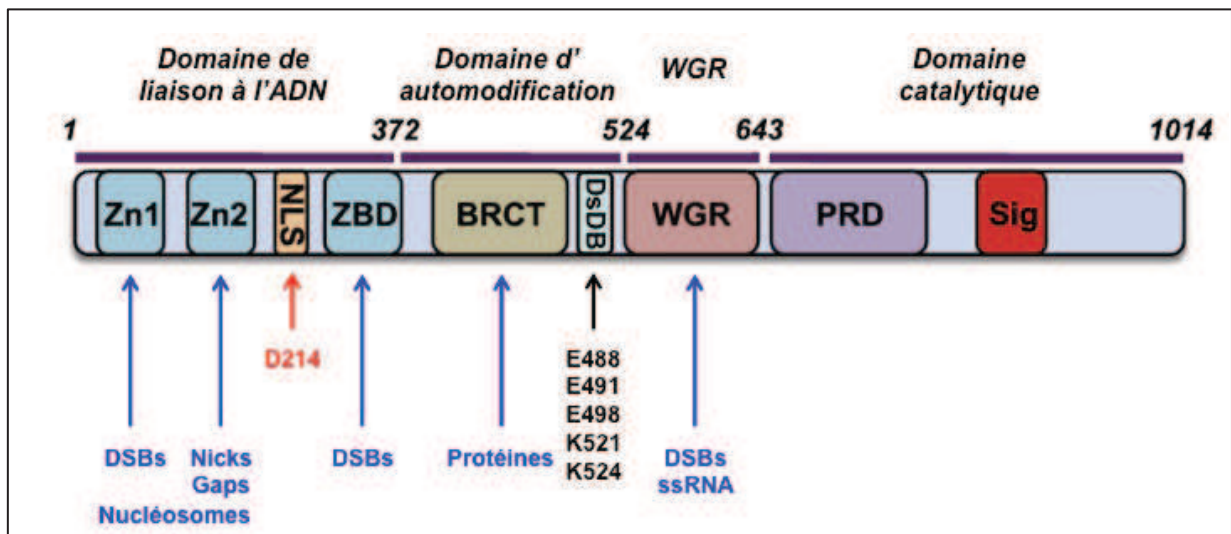


Figure 7 : structure modulaire de PARP-1 humaine et fonctions des domaines

Schéma de la structure modulaire de PARP-1 montrant les différents domaines de la protéine. En N-terminal se trouve le domaine de liaison à l'ADN. Un signal de localisation nucléaire (NLS) se trouve également dans cette région. Le site de clivage par la caspase 3 est noté en rouge. Dans le domaine d'automodification se trouvent les sites de poly(ADP-ribosylation) notés en noir. Le domaine catalytique est en C-terminal de la protéine. Les différents interactants de PARP-1 sont notés en bleus avec une flèche indiquant le domaine avec lequel ils interagissent. Figure adaptée d'après (Kraus and Hottiger, 2013).

Il a également été montré que l'activité catalytique de PARP-1 est stimulée par d'autres structures particulières de l'ADN comme les extrémités d'ADN double-brin 5' ou 3' rentrantes, le cruciforme ou la boucle (Lonskaya et al., 2005; Pion et al., 2003; Potaman et al., 2005).

Le domaine central d'automodification contient un domaine BRCT (BRCA1 C-Terminus) impliqué dans les interactions protéine-protéine et un domaine WGR riche en résidus tryptophane, glycine et arginine comme son nom l'indique. Ce dernier est vraisemblablement impliqué dans la liaison aux ARN et nécessaire à l'activité PARP (Huambachano et al., 2011; Loeffler et al., 2011). Les deux domaines sont séparés par une région fortement basique et déstructurée nommée DsDB (Double-strand break DNA Binding) qui interagit également avec les DSBs et qui contient en outre les acides aminés glutamate et lysine qui sont poly(ADP-ribosyl)és (Altmeyer et al., 2009; Tao et al., 2009) (**figure 7**).

Enfin, le domaine catalytique est le siège de l'activité de poly(ADP-ribosylation) et peut être subdivisé en 2 sous-domaines : un domaine régulateur structuré en hélices α et qui interagit avec le substrat qui sera ADP-ribosylé et la signature PARP qui forme le site de liaison au NAD^+ ainsi que le site catalytique (Hottiger et al., 2010; Kraus and Hottiger, 2013).

De récentes études ont permis de comprendre le mode de fonctionnement de PARP-1 en réponse aux DSBs. Les doigts de zinc Zn1 et ZBD interagissent avec l'ADN en compagnie du domaine WGR qui a en outre un rôle central puisqu'il fait le lien avec le domaine catalytique (**figure 8**). Ainsi, la liaison à l'ADN conduit à une restructuration du sous-domaine régulateur du domaine catalytique (nommé HD) qui permet l'activation de l'enzyme (Gagne et al., 2012; Langelier et al., 2012).

Les souris déficientes en PARP-1 générées dans plusieurs laboratoires dont le notre sont viables mais sensibles aux radiations ionisantes et aux agents alkylants, confirmant la première fonction qui avait été attribuée à PARP-1 : un rôle dans les mécanismes de réparation de l'ADN (de Murcia et al., 1997; Masutani et al., 2000; Wang et al., 1997). Depuis, d'intenses recherches ont permis de lui attribuer de nombreuses autres fonctions qui seront détaillées plus précisément dans le chapitre III qui traite des rôles principaux joués par les PARPs et PAR. Comme PARP-1 est l'enzyme la plus étudiée de la famille, nous nous intéresserons principalement à elle même si nous ne devons pas oublier sa "petite sœur" PARP-2, avec qui elle partage certaines redondances.

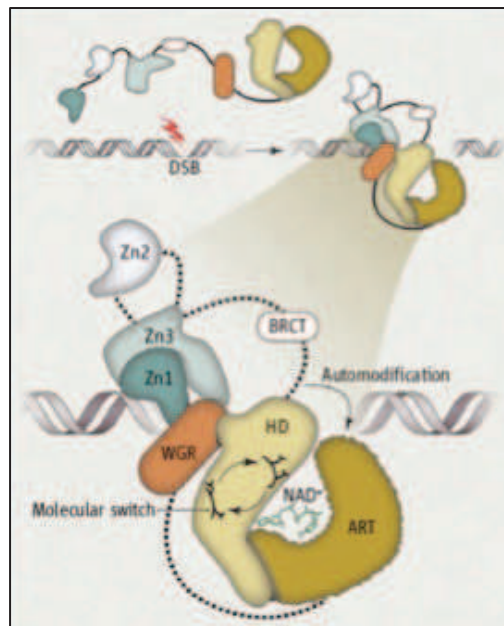


Figure 8 : mode d'activation de PARP-1 en réponse aux DSB

Schéma montrant le mode d'interaction de PARP-1 avec un DSB sur la double hélice d'ADN. PARP-1 lie la cassure grâce à ses doigts de zinc Zn1 et ZBD (ici dénommé Zn3) ainsi qu'à son domaine WGR. Le domaine WGR comme l'illustration l'indique, agit alors comme un interrupteur moléculaire sur le sous-domaine régulateur HD du domaine catalytique. Ce dernier subit un réarrangement structural altérant *in fine* le dynamisme du sous-domaine catalytique ART. Enfin, il permet le rapprochement du domaine BRCT pour faciliter l'automodification de PARP-1. D'après (Gagne et al., 2012).

2.2. PARP-2/ARTD2

PARP-2 est une protéine de 570 acides aminés et 66kDa qui est localisée comme PARP-1 dans le noyau et le nucléole. Elle a été découverte alors qu'une activité résiduelle de poly(ADP-ribosyl)ation était détectée dans des fibroblastes embryonnaires dérivés de souris PARP-1^{-/-} (Ame et al., 1999). Elle est toutefois moins exprimée et ne serait responsable que de 5 à 10% de l'activité totale de poly(ADP-ribosyl)ation. PARP-2 est le membre de la famille qui présente le plus d'homologie de séquence et de structure avec PARP-1. Leur domaine catalytique est homologue à 69% (**figure 9**). Cependant, PARP-2 a une structure modulaire moins complexe que PARP-1 dans le sens où son domaine N-terminal de liaison à l'ADN est réduit à une soixantaine d'acides aminés. Cette petite région basique est responsable de l'interaction à l'ADN et contient en outre un NLS et un NoLS (NucleoLar Localization Signal) (Meder et al., 2005). Enfin, PARP-2 contient également un domaine WGR, qui d'après les études réalisées sur PARP-1 pourrait également lier les DSBs. Le domaine de liaison à l'ADN de PARP-2 permet d'interagir avec une grande variété de structures d'ADN comme des cassures double-brin, des intermédiaires de réparation et de recombinaison, des épingles à cheveu, mais moins avec les cassures simple-brin (Kutuzov et al., 2013).

Ces similarités structurale et séquentielle sont logiquement accompagnées d'une certaine redondance fonctionnelle entre PARP-1 et PARP-2, notamment dans la surveillance et le maintien de l'intégrité du génome (Menissier de Murcia et al., 2003; Yelamos et al., 2008). D'ailleurs PARP-1 et PARP-2 peuvent s'hétérodimériser et vraisemblablement travailler de concert (Schreiber et al., 2002). Toutefois, la génération de souris déficientes en PARP-2 a révélé des fonctions spécifiques de PARP-2 notamment dans la différenciation cellulaire ou la régulation de la transcription (Bai et al., 2011; Farres et al., 2013).

Nous reparlerons des fonctions communes de PARP-2 et PARP-1 ainsi que des fonctions propres à PARP-2 dans le chapitre III relatif aux principaux rôles joués par les PARPs et le PAR.

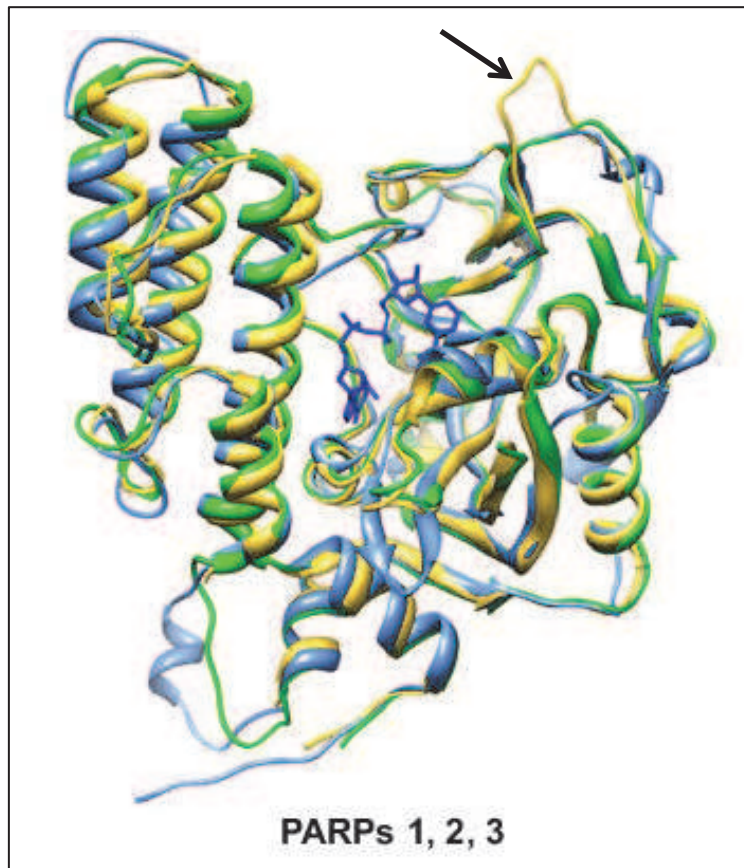


Figure 9 : homologie structurale des domaines catalytiques de PARP-1, -2, -3

Alignement des structures des domaines catalytiques de PARP-1 (PDB 1A26, vert), PARP-2 (PDB 1GSO, jaune) et PARP-3 (PDB 3FHB, bleu) de mammifères. Seule une boucle au niveau de l'entrée du site catalytique (flèche noire) ressort pour PARP-2. D'après (Krishnakumar and Kraus, 2010a).

2.3. PARP-3/ARTD3

PARP-3 a été découverte plus récemment et présente chez l'homme une particularité : 2 isoformes sont issus d'un processus d'épissage alternatif. La différence est subtile car seuls 7 acides aminés manquent à l'isoforme courte en N-terminal. La forme courte a une localisation nucléaire, tandis que la forme longue est centrosomale (Augustin et al., 2003). Chez la souris, seule la forme courte est observée. Elle contient bien sûr le domaine catalytique dont l'homologie de séquence est de 35% avec celui de PARP-1, tandis que structurellement les deux sont très semblables (**figure 9**). Elle contient un domaine WGR comme PARP-1 et PARP-2, cependant son domaine N-terminal est encore raccourci par rapport à PARP-2 et ne forme en fait qu'une hélice α .

Au niveau fonctionnel, PARP-3 est impliquée dans la progression du cycle cellulaire et la ségrégation mitotique de par sa localisation centrosomale (Boehler et al., 2011). Sa localisation nucléaire lui permet de jouer un rôle dans la régulation de la transcription et la différenciation cellulaire (interaction avec les protéines du groupe Polycomb), de même que dans la réparation des DSBs et plus précisément dans la voie du NHEJ (Boehler et al., 2011; Fenton et al., 2013; Rouleau et al., 2007; Rouleau et al., 2011; Rulten et al., 2011).

3. Les tankyrases/ARTD5 et ARTD6

Les tankyrases 1 et 2 (TRF1-interacting ankyrin-related ADP-ribose polymerase) ou PARP-5a et -5b sont elles aussi capables de poly(ADP-ribosyl)er mais apparemment sans branchement (Rippmann et al., 2002). Elles ont toutes deux la même structure modulaire à une exception : tankyrase 1 possède en N-terminal un domaine HPS (répétitions histidine-proline-sérine) contenant un motif consensus MAP kinase (PXSP). Sinon, les deux protéines contiennent 24 répétitions Ankyrine qui sont impliquées dans l'interaction avec les partenaires protéiques. Elles contiennent également un domaine SAM (Sterile Alpha Motif) permettant les interactions protéiques et de fait l'hétéro- ou homo-dimérisation des tankyrases. Enfin, nous retrouvons en C-terminal le domaine catalytique dépourvu du sous-domaine régulateur décrit dans PARP-1, PARP-2 et PARP-3 (Hsiao and Smith, 2008).

La tankyrase 1 a été décrite pour la première fois lors d'une recherche de partenaires des protéines TRF1 et TRF2 qui sont associées aux télomères. Par la suite, il a été montré que tankyrase 1 permet l'accession de la télomérase sur les télomères en poly(ADP-ribosyl)ant TRF1. Elle régule donc l'homéostasie des télomères en association avec tankyrase 2 avec laquelle elle forme un hétérodimère (Smith et al., 1998).

D'autres fonctions ont également été décrites et montrent le caractère polyvalent des PARPs dans la cellule. Tankyrases 1 et 2 régulent la voie Wnt/ β -caténine essentielle aux processus de différenciation et polarité cellulaires ou encore d'embryogenèse (Huang et al., 2009; Karner et al., 2010). En poly(ADP-ribosyl)ant l'axine qui appartient au complexe destructeur de la β -caténine dans le cytoplasme, elles favorisent la libération de la β -caténine et donc l'expression de gènes cibles. La poly(ADP-ribosyl)ation de l'axine entraîne son interaction avec l'ubiquitine ligase 3 RNF-146 via son domaine WWE de liaison au PAR, sa

poly-ubiquitylation et donc sa dégradation via le protéasome (Zhang et al., 2011). Enfin, il a été montré que la tankyrase 1 est fortement impliquée dans le processus de mitose en régulant l'assemblage des fuseaux mitotiques ainsi que les structure et fonction des centrosomes (Chang et al., 2009; Ozaki et al., 2012).

4. Les PARPs à doigt de zinc

Les PARPs à doigt de zinc sont au nombre de 3 : TiPARP ou ARTD14, PARP-12 ou ARTD12 et PARP-13 ou ARTD13, et elles possèdent toutes au moins un doigt de zinc de type Cys-X₇₋₁₁-Cys-X₃₋₉-Cys-X₃-His.

4.1. Ti-PARP/ARTD14

Le nom Ti-PARP (TCDD-Inductible PARP) lui a été donné suite à une étude ayant montré que son expression est inductible par la dioxine cancérigène TCDD (2,3,7,8-TétraChloroDibenzo-p-Dioxine) via le récepteur nucléaire AHR (Aryl Hydrocarbon Receptor) (Ma et al., 2001). Ti-PARP est en retour un régulateur négatif de ce même récepteur AHR. En liant les promoteurs de gènes AHR-dépendants (via l'ADN directement ou via le récepteur AHR), il entrave la transactivation du récepteur mais augmente aussi sa dégradation via le protéasome. Ceci entraîne donc la diminution de l'expression des gènes qui sont sous son contrôle, dont le gène de Ti-PARP lui-même (MacPherson et al., 2013).

Une autre étude a également montré que Ti-PARP possède une fonction antivirale en entravant la réplication des alpha-virus (Atasheva et al., 2012).

4.2. PARP-12/ARTD12

PARP-12 est un membre de la famille PARP assez méconnu, cependant nous savons que deux isoformes sont présentes chez l'homme dont une courte dépourvue du domaine catalytique. Il a été montré que l'isoforme longue est impliquée dans la réduction de la réplication virale tout comme Ti-PARP (Atasheva et al., 2012). Leur mode d'action reste toutefois inconnu. Il a également été montré que PARP-12 est surexprimée dans l'endomètre d'animaux en gestation (Bauersachs et al., 2006).

4.3. PARP-13/ARTD13

PARP-13 est semblable à PARP-12 du fait de la présence de deux isoformes chez l'homme, dont la plus courte étant également dépourvue du domaine catalytique. Chez le rat, les deux isoformes sont dépourvues du domaine catalytique et sont nommées ZAP (Zinc-finger Antiviral Protein) et ZAPS (Zinc-finger Antiviral Protein Shorter isoform). PARP-13 possède également une fonction antivirale mais son mode d'action est mieux décrit. En effet, elle reconnaît les ARN viraux et recrute alors l'exosome ARN ainsi que l'ARN hélicase p72 permettant la dégradation de l'ARN viral et inhibant indirectement la réplication virale (Zhu and Gao, 2008). Il a également été montré que l'isoforme courte ZAPS induit la production d'interférons à la suite de son interaction avec l'ARN hélicase RIG-1 (Retinoic-acid Inducible Gene1), activant de fait la réponse immunitaire antivirale innée (Hayakawa et al., 2011). PARP-13 a donc un double rôle dans la réponse antivirale : la dégradation des ARN viraux et la stimulation de la réponse immunitaire innée.

5. Les macro-PARPs

Il existe 3 membres de la famille PARPs qui possèdent au moins 1 domaine macro décrit précédemment (voir I.5.2) : PARP-9 ou BAL-1 (B Aggressive Lymphoma protein 1), PARP-14 ou BAL-2 et PARP-15 ou BAL-3. Ces protéines sont codées à partir de 3 gènes situés en tandem sur le chromosome 3 chez l'homme. Cette localisation génique laisse à penser que leur expression puisse être coordonnée ou que ces protéines partagent certaines fonctions communes (Aguilar et al., 2005).

5.1. PARP-9/ARTD9

PARP-9 est surexprimée dans les lymphomes diffus à large cellules B – d'où son nom BAL-1 – et son expression est induite par l'interféron- γ . En retour, elle stimule l'expression de gènes sous la dépendance de l'interféron. Elle jouerait un rôle dans la dissémination des cellules B malignes car elle est capable de stimuler la migration lymphocytaire *in vitro* (Aguilar et al., 2000). Elle est fortement exprimée dans le cerveau, le tractus intestinal et les organes lymphoïdes (Hakme et al., 2008a).

Une étude récente a en outre montré que PARP-9 est impliquée dans la réponse cellulaire aux DSBs. L'activation de PARP-1 et la synthèse de PAR au site du dommage, entraîne le recrutement de BAL-1 via son domaine macro et de son partenaire BBAP (B-lymphoma and BAL-Associated Protein). BBAP, via son activité ubiquitine ligase, permet le recrutement local de 53BP1 (Tumor suppressor p53 Binding Protein1) et BRCA1 (BReast Cancer type1 susceptibility protein), toutes deux impliquées dans la signalisation et la réparation du dommage (Yan et al., 2013).

5.2. PARP-14/ARTD8

PARP-14 est également nommée CoaSt6 (Collaborator of STAT6) car elle est un partenaire important du facteur de transcription STAT6 (Signal Transducer and Activator of Transcription 6). PARP-14 et STAT6 interagissent de manière constitutive dans les cellules lymphoïdes et en réponse à l'interleukine 4 (IL-4), PARP-14 devient coactivateur transcriptionnel de STAT6 (Mehrotra et al., 2011). Il a été montré que PARP-14 poly(ADP-ribosyl)e les histones déacétylases 2 et 3 (HDAC 2 et 3) permettant leur éviction de la chromatine et la fixation subséquente de STAT6 sur les promoteurs de gènes STAT6-dépendants.

Parallèlement, PARP-14 joue également un rôle protecteur pour les cellules B en les épargnant d'une mort cellulaire par apoptose dépendante de la caspase 3 (Cho et al., 2009).

5.3. PARP-15/ARTD7

PARP-15 est certainement la moins étudiée des PARPs et seule une étude montre sa localisation dans les granules de stress cytoplasmiques et donc son potentiel rôle dans la régulation post-transcriptionnelle des gènes. Elle agirait de concert avec d'autres PARPs : tankyrase 1, PARP-12 et PARP-13 (Leung et al., 2012).

6. Les autres PARPs

Ce paragraphe décrit les PARPs restantes que nous ne pouvons regrouper.

6.1. PARP-4/ARTD4

PARP-4 ou vPARP est un composant du complexe ribonucléique Vault. Ce complexe est impliqué dans le transport intra-cellulaire ou la résistance des cellules tumorales aux drogues. Plus précisément, ce complexe est formé d'un ARN nommé vRNA et de 3 protéines : PARP-4, MVP (Major Vault Protein) et TEP-1 (Telomerase Associated Protein-1). PARP-4 est capable de poly(ADP-ribosyl)er MVP pour réguler les fonctions du complexe Vault (Kickhoefer et al., 1999). Une faible proportion de vPARP est également localisée au niveau du fuseau mitotique.

Récemment une étude a également montré l'implication de PARP-4 dans la réparation des DSBs (Lara et al., 2011).

6.2. PARP-6/ARTD17

PARP-6 a récemment été décrite pour la première fois et elle est visiblement impliquée dans le processus de prolifération cellulaire. En effet, il a été montré qu'elle régule négativement la prolifération cellulaire, et ce dépendamment de son domaine catalytique. Elle semble jouer un rôle de suppresseur de tumeur dans certains cancers colorectaux (Tuncel et al., 2012).

6.3. PARP-10/ARTD10

PARP-10 est une protéine nucléaire et cytoplasmique car elle contient des motifs NLS et NES. Elle possède également un motif de liaison à l'ARN (RRM), 2 motifs d'interaction à l'ubiquitine et une région riche en glycine permettant l'interaction avec les acides nucléiques. Elle intervient dans le contrôle de la prolifération cellulaire via son interaction avec le proto-oncogène et régulateur transcriptionnel c-Myc (Yu et al., 2005). Comme PARP-10 fait la navette entre le cytoplasme et le noyau et qu'elle contient des motifs de liaison à l'ARN, les auteurs proposent qu'elle puisse être impliquée dans l'export des ARNr vers le cytoplasme. De plus, c-Myc contrôle la prolifération en modulant l'expression de gènes de protéines ribosomales ou de facteurs permettant l'export des sous-unités ribosomales du noyau vers le cytoplasme. Les auteurs montrent que PARP-10 inhibe la transformation des fibroblastes d'embryons de rats, et ce indépendamment de son activité catalytique PARP.

PARP-10 est phosphorylée par CDK2 (Cyclin Dependant Kinase 2) uniquement dans le nucléole en phase G1/S, ce qui lui permet de se lier au complexe de l'ARN polymérase I et ce qui augmente son activité catalytique. Les études montrent que la déplétion de PARP-10 induit un ralentissement des cellules en G1, puis la mort cellulaire (Chou et al., 2006).

PARP-10 semble également être impliquée dans la réponse antivirale, plus précisément en limitant la réplication des virus (Yu et al., 2011) ou encore dans la signalisation intra-cellulaire en ADP-ribosylant la kinase GSK3 β (Glycogen Synthase Kinase 3 β) (Feijs et al., 2013).

6.4. PARP-16/ARTD15

PARP-16 est une très petite protéine ne contenant que le domaine PARP. Elle n'a été décrite que récemment et elle est localisée dans le réticulum endoplasmique grâce à un domaine de localisation transmembranaire, où il a été montré qu'elle ADP-ribosyle le facteur de transport nucléaire Kap β 1 (Di Paola et al., 2012).

6.5. PARP-8 et -11

Aucune fonction n'a encore été décrite concernant ces deux PARPs.

III. Les fonctions des PARPs et du PAR

1. Organisation, expression et intégrité du génome

1.1. Les mécanismes d'action des PARPs sur la chromatine

De nombreuses études ont permis de montrer les différentes fonctions que jouent PARP-1 et dans une moindre mesure PARP-2 dans la modulation de la structure de la chromatine et dans l'organisation du génome. PARP-1 est en effet capable de moduler la structure de la chromatine par l'intermédiaire de deux mécanismes distincts : **l'action directe** via l'interaction avec le nucléosome et/ou la poly(ADP-ribosyl)ation des histones et **l'action indirecte** via le recrutement de facteurs de remodelage/modification de la chromatine ou de variants d'histones.

1.1.1. L'action directe de PARP-1 sur la chromatine

L'action directe a été décrite la première fois dans les années 1980s et depuis de nombreuses études ont permis d'y voir plus clair (de Murcia et al., 1986; Poirier et al., 1982). Il est admis que la poly(ADP-ribosyl)ation des histones H2B et H1 induite par des cassures dans l'ADN entraîne une décondensation locale, ce qui permettrait aux facteurs de réparation d'accéder aux dommages (De Vos et al., 2012). Néanmoins, une autre étude a également montré que PARP-1 interagit préférentiellement avec les histones H3 et H4 dans un contexte nucléosomal et que la queue N-terminale de H4 active PARP-1 au contraire de H2A (Pinnola et al., 2007). Il semblerait que des stimuli autres que des cassures dans l'ADN puisse activer localement PARP-1 en jouant sur l'exposition de la queue N-terminale de H4 et l'activation subséquente de PARP-1. Il a en outre été montré que PARP-1 est capable de poly(ADP-ribosyl)er toutes les histones du nucléosome (Messner et al., 2010). Le choix de l'histone modifiée dépendrait ainsi du processus mis en jeu (réparation, transcription, ...) et donc du contexte épigénétique et de l'accessibilité de certaines queues N-terminales d'histones (Messner and Hottiger, 2011).

En revanche, en absence de NAD^+ et donc d'activité catalytique, PARP-1 promeut la compaction *in vitro* de la chromatine semblable à celle opérée par l'histone H1 (**figure 10**) (Wacker et al., 2007). En effet, il a été montré que PARP-1 entre en compétition avec l'histone H1 pour la liaison au nucléosome (Kim et al., 2004). Son mécanisme d'action est en fait comparable à H1, elle se lie au niveau des points d'entrée et de sortie de l'ADN et rapproche les nucléosomes voisins conduisant ainsi à un niveau supérieur de condensation de la chromatine inaccessible par les nucléases.

Récemment, le mode d'interaction de PARP-1 avec le nucléosome a été décrit et il se trouve que ce sont les doigts de zinc Zn1 et ZBD qui interagissent préférentiellement avec le nucléosome (Clark et al., 2012). Après ajout de NAD^+ , PARP-1 est auto-modifiée et quitte la chromatine vraisemblablement par le biais des répulsions de charges négatives qui ont lieu entre le PAR et l'ADN (Wacker et al., 2007).

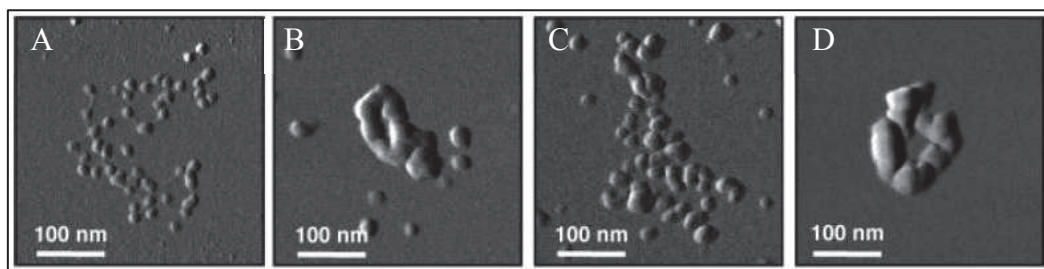


Figure 10 : la modulation de la structure de la chromatine par PARP-1

Observation au microscope à force atomique de la chromatine seule (A), après ajout de PARP-1 avec (C) ou sans NAD^+ (B) et après ajout de l'histone H1 (D). PARP-1 induit une condensation de la chromatine comparable à celle de l'histone H1, mais qui est entravée par la présence de NAD^+ . D'après (Wacker et al., 2007).

En ce qui concerne PARP-2, aucune étude n'a permis pour l'instant de montrer une potentielle action directe sur la chromatine. Il a été rapporté qu'elle ne modifierait aucune histone du nucléosome *in vitro* au contraire de PARP-1 (Messner et al., 2010). Au laboratoire, nous avons toutefois pu mettre en évidence une modification *in vitro* des histones par PARP-2, et plus particulièrement de l'histone H2B, en utilisant des histones purifiées et des noyaux de foie de souris isolé (Kalisch T., mémoire de Master 2, 2009).

1.1.2. L'action indirecte de PARP-1 et de PARP-2 sur la chromatine

L'action indirecte consiste à recruter les facteurs de remodelage/modification de la chromatine ou des variants d'histones pour moduler la structure de cette dernière. Plusieurs mécanismes sont maintenant décrits dans la littérature.

1.1.2.1. La modification de la composition des nucléosomes

En parallèle de la modification directe des histones, il est également possible de modifier localement la composition de la chromatine en remplaçant les histones classiques par des variants. Ainsi, il a été montré que PARP-1 peut recruter le variant d'histone macroH2A1.1 qui, comme son nom l'indique, possède un domaine macro de liaison au PAR (Timinszky et al., 2009). En réponse aux dommages dans l'ADN, l'activation de PARP-1 induit localement une forte concentration en PAR qui permet le recrutement de macroH2A1.1 et la compaction de la chromatine entravant le recrutement des facteurs de réparation Ku70 et Ku80.

Une telle modulation de la chromatine via macroH2A1.1 peut également se concevoir en l'absence de dommages à l'ADN, lorsque PARP-1 est activée par un autre stimulus. Une étude a ainsi montré que l'histone macroH2A1.1 est présente dans les nucléosomes localisés au niveau des promoteurs de gènes inductibles Hsp70.1 ou Hsp70.2 (Ouararhni et al., 2006). Le variant d'histone interagit avec PARP-1 et inactive localement son activité enzymatique. En réponse à un choc de température, les deux protéines sont évincées de la chromatine et PARP-1 est réactivée, ce qui entraîne la transcription des gènes.

PARP-2 a également été impliquée avec PARP-1 dans la régulation de la chromatine via le remplacement d'histones. En effet, les deux PARPs interviennent dans le processus de spermatogenèse chez les mammifères en modulant l'étape cruciale de condensation de la chromatine (Quenet et al., 2009). Pour ce faire, elles permettent le remplacement des histones classiques par les protéines de transition TP1 et TP2 puis par les protamines. Chez la souris, les souris déficientes en PARP-2 subissent un délai sévère dans la condensation de la chromatine induisant une mort précoce au stade de spermatides (Dantzer et al., 2006).

1.1.2.2. La modulation de la chromatine par des facteurs de remodelage

PARP-1 peut également agir sur des facteurs de remodelage de la chromatine comme ALC1 (Amplified in Liver Cancer 1), le complexe FACT (FAcilitates Chromatin Transcription) ou encore ISWI chez *Drosophila melanogaster*. ALC1 est une ATPase de la famille SNF2 impliquée dans le remodelage de la chromatine. Elle est recrutée sur le site de dommages à l'ADN via son domaine macro de liaison au PAR, son activité ATPase est stimulée et elle peut déplacer les nucléosomes localement (Ahel et al., 2009). Dans la même famille, l'activité ATPase de l'enzyme ISWI est diminuée lorsque elle est hétéromodifiée par PARP-1 chez la drosophile (Sala et al., 2008). Enfin, l'activité du complexe de remodelage de la chromatine FACT est régulée par PARP-1 qui le décroche de la chromatine en poly(ADP-ribosyl)ant sa sous-unité hSpt16 (Huang et al., 2006).

1.1.2.3. La modification du paysage épigénétique

PARP-1 peut faire appel à des enzymes de modification de la chromatine, dont les cibles préférentielles sont les histones. C'est le cas par exemple de l'enzyme KDM5B (lysine (K) specific DeMethylase 5B) qui est une histone déméthylase agissant sur la modification H3K4me3 et dont l'activité est réduite après poly(ADP-ribosyl)ation. Sa modification entraîne donc une diminution de la déméthylation correspondante et une activation locale de la transcription (Krishnakumar and Kraus, 2010b).

A l'inverse, PARP-1 promeut l'hétérochromatinisation de la chromatine au niveau des gènes d'ADNr (ADN ribosomique) transcriptionnellement éteints (~50% des gènes totaux) en interagissant avec le complexe NoRC (Nucleolar Remodelling Complex) et en permettant le maintien du paysage épigénétique après la réplication (Guettg et al., 2012).

Une étude réalisée conjointement avec le laboratoire a également impliquée la PARG et le PAR dans la régulation de la transcription des gènes sous la dépendance de l'acide rétinoïque via la modulation de la chromatine au niveau des promoteurs (Le May et al., 2012). En effet, la PARG entrave la poly(ADP-ribosyl)ation de l'enzyme KDM4D par PARP-1, ce qui permet la déméthylation de H3K9me2 par KDM4D et l'activation de la transcription.

Enfin, une étude a récemment montré le recrutement PAR-dépendant de la déméthylase KDM4B sur les DSBs (Young et al., 2013). KDM4B promeut la réparation et la survie cellulaire en déméthylant les histones H3K9me3 qui représentent une barrière épigénétique au processus de réparation.

Certaines évidences ont montré également que PARP-2 agit sur les modifications épigénétiques touchant les histones. En effet, comme nous l'avons vu précédemment, PARP-2 joue un rôle important lors du processus de spermatogenèse chez la souris. Ainsi, les spermatocytes PARP-2^{-/-} sont caractérisés par une dérégulation des profils de méthylation et d'acétylation des histones (Dantzer et al., 2006).

1.1.2.4. La modulation de la méthylation de l'ADN

PARP-1 est également impliquée dans la régulation de la méthylation de l'ADN via la régulation de l'enzyme DNMT1 (DNA MethylTransférase 1) (Reale et al., 2005). Comme ce mode d'action lui permet de réguler la transcription, il sera détaillé plus précisément dans le paragraphe III.1.2.4.

En conclusion, ces différents modes d'action permettent à PARP-1 et PARP-2 de moduler à souhait la chromatine et donc plus globalement l'organisation du génome. Ceci leur permet d'intervenir dans des processus plus ciblés comme l'expression des gènes ou encore la surveillance de l'intégrité du génome.

1.2. La régulation de l'expression des gènes

Les PARPs jouent un rôle majeur dans la régulation de la transcription des gènes et modulent ainsi de nombreux processus cellulaires (**figure 11**). Une analyse de l'expression génique par microarray a ainsi été conduite dans des cellules souches embryonnaires ou de foie murines PARP-1^{-/-} et a montré l'impact important de PARP-1 sur ce processus. En effet, l'absence de PARP-1 induit des altérations dans l'expression de plus de 9% des gènes (Ogino et al., 2007). Des études avaient par ailleurs déjà montré que PARP-1 n'est autre que TFIIIC,

le facteur basal de transcription de l'ARN polymérase II resté longtemps indéterminé (Slattery et al., 1983). Ceci abonde dans le sens d'un rôle important de PARP-1 dans la transcription. PARP-1 est capable de moduler ce processus à travers plusieurs modes d'action. Elle régule l'expression des gènes avant tout en modulant la structure et la composition de la chromatine (voir chapitre III.1.1 et **figure 11**). En outre, elle peut aussi interagir directement avec les promoteurs ou enhancers des gènes, jouer le rôle de co-régulateur ou encore agir directement sur les facteurs de transcription. Enfin, PARP-1 joue un rôle central dans le mécanisme d'insulation et de méthylation de l'ADN (Kraus, 2008; Kraus and Hottiger, 2013; Szanto et al., 2012).

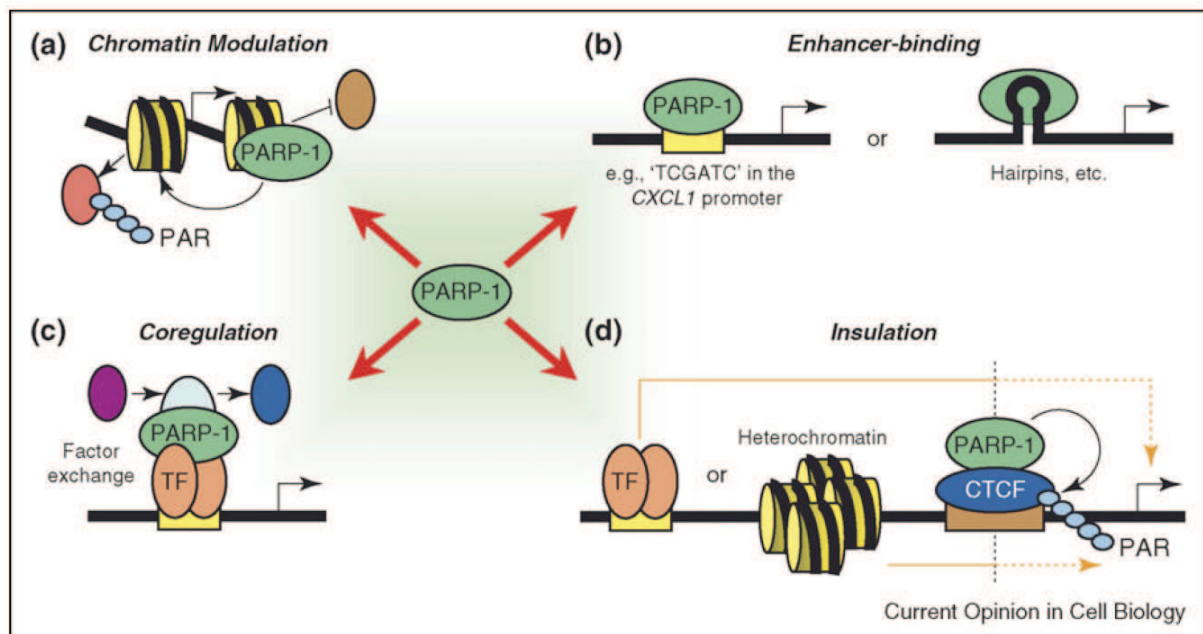


Figure 11 : modes d'action de PARP-1 sur la régulation de la transcription

PARP-1 module l'expression des gènes en (a) modifiant localement la structure de la chromatine à l'aide de son activité enzymatique ou via l'interaction avec le nucléosome, (b) en interagissant spécifiquement au niveau du promoteur via une séquence ou une structure spécifiques, (c) en co-régulant la transcription des gènes via la régulation des co-facteurs de transcription ou en (d) jouant sur l'insulation en empêchant la dissémination de l'hétérochromatine via CTCF ou l'impact des régions enhancer sur le promoteur d'un gène. D'après (Kraus, 2008).

1.2.1. Les PARPs contrôlent la transcription en modulant la chromatine

Des études récentes ont montré par ChIP-chip que PARP-1 est enrichie au niveau des promoteurs de gènes transcrits par l'ARN polymérase II, au contraire de l'histone H1. Comme nous l'avons vu précédemment, PARP-1 entre en compétition avec l'histone H1 pour la liaison au nucléosome. PARP-1 remplace donc l'histone H1 au niveau des promoteurs de gènes transcriptionnellement actifs pour favoriser une structure de la chromatine permissive (Krishnakumar et al., 2008). De plus, les gènes positivement régulés par PARP-1 sont sous-exprimés dans les cellules déficientes en PARP-1 car leurs promoteurs sont à nouveau occupés par H1 et donc moins accessibles aux facteurs de transcription ainsi qu'à l'ARN polymérase II (Krishnakumar and Kraus, 2010b). L'effet inverse est observé pour des gènes négativement régulés par PARP-1. Ces études démontrent que PARP-1 contrôle la transcription en faisant partie intégrante de la chromatine afin de moduler son état de condensation et donc son niveau de permmissivité à la transcription.

Premièrement, il a été montré que PARP-1 active la transcription en modulant l'ouverture de la chromatine en réponse à certains stimuli. C'est par exemple le cas chez la drosophile lors d'un choc de température (heat-shock). En effet, la forte hausse de température induit l'activation catalytique de PARP-1 qui en retour entraîne la décondensation locale de la chromatine via l'éviction de nucléosomes. Ce processus permet la transcription de gènes spécifiques au heat-shock comme Hsp70 (Petesch and Lis, 2012; Tulin and Spradling, 2003). Il a même été montré que l'activation de PARP-1 à ce locus est due à la présence du variant d'histone H2Av (homologue des histones H2Ax et H2Az chez les mammifères). Le variant module en fait la structure du nucléosome et permettrait l'activation de PARP-1 en jouant sur l'accessibilité de la queue N-terminale de H4 (Kotova et al., 2011; Pinnola et al., 2007).

Deuxièmement, les PARPs modulent négativement la transcription en promouvant l'hétérochromatinisation. Le laboratoire a ainsi montré une implication de PARP-1 et de PARP-2 dans la formation de l'hétérochromatine lors du processus de différenciation endodermale (Quenet et al., 2008). L'étude a mis au jour l'interaction de PARP-1 et PARP-2 avec la protéine HP1 α qu'elles poly(ADP-ribosyl)ent toutes deux. Durant la différenciation, les protéines se retrouvent localisées au niveau de l'hétérochromatine péricentrique avec le facteur de transcription TIF1 β (Transcription Intermediary Factor 1 β) qui interagit également

avec PARP-1 et PARP-2. Les PARPs contrôlent la différenciation endodermale en permettant la relocalisation de TIF1 β et en modulant son activité transcriptionnelle via l'expression de gènes spécifiques de l'endoderme et la répression de gènes spécifiques du mésoderme.

Nous l'avons vu dans le chapitre précédent III.1.1, les PARPs sont également capables de moduler la transcription en jouant sur le paysage épigénétique local de la chromatine. Par exemple, PARP-1 module l'activité de protéines comme KDM5B ou KDM4D, ce qui lui permet de réguler la transcription de certains gènes en fonction des modifications épigénétiques. Une autre étude a également permis de montrer que PARP-1 joue un rôle prépondérant dans le maintien de l'hétérochromatine ribosomale qui touche environ la moitié des gènes ribosomiques. En interagissant avec le complexe NoRC et les gènes ribosomiques transcriptionnellement éteints de suite après leur réplication, PARP-1 promeut le maintien des modifications épigénétiques comme la méthylation des CpG grâce à son activité catalytique (Guettg and Santoro, 2012). Rappelons à ce propos que PARP-1 est capable de moduler l'activité de DNMT1 et donc de réguler la transcription de gènes via la méthylation des motifs CpG jouant un rôle dans la fixation des facteurs de transcription (Deaton and Bird, 2011).

Récemment, il a été montré que PARP-2 module l'activité des deux déacétylases d'histones HDAC5 et HDAC7 et d'une méthyltransférase G9a au niveau de promoteurs de gènes régulant le cycle cellulaire (Liang et al., 2013). Les auteurs montrent que PARP-2 induit la formation d'une chromatine répressive et donc la répression de l'expression de ces gènes, lui permettant ainsi de réguler le cycle cellulaire.

Ainsi PARP-2 est capable comme PARP-1 de moduler la transcription en jouant sur les modifications épigénétiques de la chromatine ou sur sa composition.

1.2.2. Les PARPs sont des co-régulateurs de la transcription

Les PARPs peuvent aussi moduler la transcription en jouant sur la co-régulation via l'interaction avec de nombreux facteurs ou cofacteurs de la transcription.

PARP-1 interagit avec de nombreux facteurs de transcription dont elle module l'activité ou la liaison au promoteur, c'est le cas de NF- κ B (Nuclear Factor- κ B), Oct-1, Sox2,

Snail1 ou encore NFAT (Nuclear Factor of Activated T-cells) (Hassa et al., 2003; Hassa et al., 2005; Lai et al., 2012; Nie et al., 1998; Olabisi et al., 2008; Rodriguez et al., 2011; Stanisavljevic et al., 2011; Valdor et al., 2008). Le mode d'action n'est pas identique, en effet PARP-1 inhibe ou active la transcription en usant de son activité catalytique ou non (Kraus and Hottiger, 2013).

Dans le cas précis de NF- κ B, l'activité de PARP-1 ne semble pas requise pour l'activation de NF- κ B par les cytokines inflammatoires (Hassa et al., 2001; Oliver et al., 1999). En revanche, elle est requise pour l'activation de NF- κ B en réponse aux dommages à l'ADN, en favorisant la formation d'un complexe dit signalosome contenant PIASy (Protein Inhibitor of Activated STAT Y), ATM (Ataxia Telangiectasia Mutated) et le régulateur NEMO qui, une fois SUMOylé, va activer la voie NF- κ B (Hunter et al., 2012; Stilmann et al., 2009).

Dans certains cas, PARP-1 ne lie pas directement les facteurs de transcription mais agit plutôt à travers un complexe régulateur présent au niveau du promoteur et permettant par exemple l'échange de facteurs répressifs par des facteurs activateurs. C'est la cas par exemple lors de la transcription dépendante de l'acide rétinoïque où elle permet la transformation du complexe médiateur répressif Cdk8+ en complexe permissif CdK8- (Pavri et al., 2005). PARP-1 promeut également le passage d'un complexe répressif contenant les facteurs NCoR et HDAC3 vers un complexe activateur comprenant la topoisomérase II β lors de l'activation de la transcription dépendante de l'oestradiol E2 (Ju et al., 2006). La transcription est alors stimulée à l'aide d'un mécanisme original faisant intervenir l'activité de la topoisomérase II β , qui une fois présente sur le promoteur induit un clivage de l'ADN. Le clivage permet de résoudre une barrière topologique afin de relaxer localement la chromatine et elle active PARP-1 ce qui permet l'éviction de l'histone H1 (Ju and Rosenfeld, 2006).

PARP-2 module également l'activité de facteurs de transcription comme TTF1 (Thyroid Transcription Factor-1) et TIF1 β ou des récepteurs nucléaires comme les récepteurs à l'œstrogène (ER α) et les récepteurs activés par les proliférateurs de peroxyosomes (PPAR α - δ - γ) (Bai et al., 2007; Maeda et al., 2006; Quenet et al., 2008).

1.2.3. Les PARPs sont des facteurs de transcription ?

Etant donné la propension de PARP-1 et PARP-2 à pouvoir lier l'ADN, il n'est pas si surprenant de les voir intervenir directement sur la transcription en tant que facteur de transcription ou enhancer.

Ainsi, PARP-1 interagit directement avec les promoteurs de plusieurs gènes et module leur expression. PARP-1 interagit par exemple avec les séquences MCAT1 en compagnie du transcription enhancer factor 1 et régule ainsi la transcription de gènes spécifiques des muscles (Butler and Ordahl, 1999). Elle régule négativement l'expression du gène CXCL1 (Chemokine (C-X-C motif) Ligand 1) en se liant à des séquences promotrices et en entravant la liaison voisine de NF- κ B et l'activation subséquente de la transcription (Nirodi et al., 2001).

PARP-2 module directement l'expression de la déacétylase NAD⁺-dépendante SIRT1 (sirtuin 1) en interagissant directement avec la région comprise entre -1 et -90 du promoteur du gène SIRT1. Il s'avère qu'en l'absence de PARP-2, SIRT1 est surexprimée et conduit alors à une suractivation du métabolisme mitochondrial (Bai et al., 2011).

1.2.4. La régulation de la méthylation de l'ADN

PARP-1 joue également un rôle dans l'organisation du génome via le processus de méthylation de l'ADN (Caiafa and Zampieri, 2005; Reale et al., 2005). En effet, il a été montré que PARP-1 régule l'expression et l'activité de DNMT1 (DNA MéthylTransférase 1) via l'autopoly(ADP-ribosylation) de PARP-1 (Zampieri et al., 2009). L'activité de DNMT1 est ainsi inhibée par le PAR, empêchant la méthylation des CpG (Caiafa et al., 2009). Il a ainsi été montré que l'inhibition de PARP-1 induit une hyperméthylation anormale de l'ADN y compris de certains îlots CpG (Zardo and Caiafa, 1998).

Parallèlement, il a été montré que PARP-1 module également l'action de la protéine CTCF (CCCTC-binding Factor) qui se lie à des séquences spécifiques appelées insulateurs. Les insulateurs sont des séquences permettant de limiter l'action des enhanceurs ou promoteurs sur une trop longue distance ou la dispersion de l'hétérochromatine. CTCF stimule PARP-1

qui en retour poly(ADP-ribosyl)e CTCF et lui permet de se lier à ces séquences insultrices (Yu et al., 2004). Récemment, une étude a même démontré l'existence d'un complexe PARP-1/DNMT1/CTCF où l'activité de DNMT1 est contrôlée par le PAR produit par PARP-1 elle-même stimulée par CTCF. L'inhibition de DNMT1 entrave donc la méthylation des sites CpG liés par CTCF et préserve leur paysage épigénétique (Zampieri et al., 2012). Enfin, le même laboratoire a récemment montré que l'absence de PAR – causée par la surexpression de PARG – entraîne la délocalisation de CTCF vers la périphérie du noyau et de profonds changements dans l'architecture de la chromatine (Guastafierro et al., 2013). CTCF régule donc le paysage épigénétique de nombreux gènes via un processus PAR-dépendant.

Ces différents mécanismes de régulation de la transcription permettent à PARP-1 et PARP-2 d'influer sur la vie, la différenciation, la prolifération et la mort cellulaires.

1.3. La surveillance de l'intégrité du génome

A chaque instant de la vie cellulaire, l'ADN est la cible de multiples attaques pouvant mettre en danger son intégrité. Les altérations de bases ou les cassures générées sont donc un sérieux défi pour la cellule en terme de stabilité génétique et de survie cellulaire. Cependant, l'évolution a mis au point de multiples stratégies afin de prémunir la cellule de ces multiples atteintes faites à l'encontre de son ADN. En général le mode d'action est identique, il s'agit de détecter et de reconnaître le dommage, le signaler et enfin permettre sa réparation.

Une des fonctions majeures attribuée à PARP-1 concerne la surveillance de l'intégrité du génome. Par la suite, c'est PARP-2 qui y a été associée, et plus récemment encore PARP-3 (De Vos et al., 2012). Elles sont toutes trois impliquées dans divers processus relatifs au maintien de l'intégrité du génome, ou le cas échéant, à la réparation de certains dommages survenant dans l'ADN. Elles peuvent travailler de concert – nous savons que PARP-1 et PARP-2 peuvent s'hétérodimériser ou que PARP-3 peut activer PARP-1 en absence d'ADN – ou au contraire agir individuellement. Concernant le maintien de l'intégrité du génome, nous savons que PARP-1, PARP-2, PARP-3 et même les tankyrases peuvent contrôler – de manière isolée ou de concert – des régions sensibles comprenant des régions répétées comme les télomères et les centromères, mais elles régulent également le maintien de l'hétérochromatine facultative (chromosome X inactivé chez les femelles mammifères)

(Boehler et al., 2011; Dantzer et al., 2004; Dantzer et al., 2006; Gomez et al., 2006; Saxena et al., 2002a; Saxena et al., 2002b; Smith et al., 1998). Parallèlement, les dommages dans l'ADN de type SSB (Single Strand Breaks), altération de base ou DSB qui sont réparées respectivement par les voies des SSBR (Single Strand Break Repair), BER (Base Excision Repair) et DSBR (Double Strand Break Repair) sont régulées par au moins une de ces 3 PARPs (De Vos et al., 2012).

Les souris PARP-1^{-/-} et PARP-2^{-/-} générées au laboratoire sont viables, mais présentent une sensibilité accrue aux radiations ionisantes et aux agents génotoxiques, alors que les souris PARP-1^{-/-}/PARP-2^{-/-} meurent au niveau embryonnaire (de Murcia et al., 1997; Menissier de Murcia et al., 2003; Yelamos et al., 2008). PARP-1 et PARP-2 ont donc vraisemblablement des fonctions redondantes en plus de leurs fonctions spécifiques. Un exemple de redondance tout au moins partielle concerne les mécanismes de réparation des cassures simple-brin de l'ADN.

1.3.1. La réparation des cassures simple-brin

Les cassures simple-brin dans l'ADN peuvent être causées par l'action d'enzymes ou de composés métaboliques. Les ROS (Reactive Oxygen Species) provenant directement du métabolisme respiratoire de la cellule peuvent oxyder toutes les macromolécules biologiques. Au niveau de l'ADN, elles génèrent en moyenne 20000 modifications de bases de type 8-oxoguanine par jour et par cellule. Les agents alkylants (ex : témozolomide ou N-méthyl-N'-nitrosoguanidine (MNNG)) induisent également une modification de base par adjonction d'un groupe alkyl (C_nH_{2n+1}) sur les guanines. Ces modifications de bases seront réparées par le système BER qui génère *in fine* des SSB prises en charge par le SSBR. Des SSB peuvent également être directement générées par des radiations ionisantes (rayons X ou γ) ou via l'activité interrompue des enzymes topoisomérases de type I (**figure 12**). Dans le BER, la base endommagée est prise en charge par une ADN glycosylase qui clive la liaison N-glycosidique entre la base et le squelette sucre-phosphate. Ce clivage induit alors la formation d'un site abasique ou AP (APyrimidique ou APurique) qui est traité par une AP endonucléase APE1 pour générer une cassure simple-brin (Caldecott, 2007).

Il a été montré que PARP-1 intervient dans le BER/SSBR en reconnaissant la cassure, ce qui stimule son activité enzymatique et permet le recrutement de protéines qui vont réparer le dommage (El-Khamisy et al., 2003; Lindahl et al., 1995; Masson et al., 1998; Okano et al., 2003). C'est le cas par exemple de XRCC1 et de l'ADN ligase III qui contiennent toutes deux un motif de liaison au PAR (voir chapitre I.5.1).

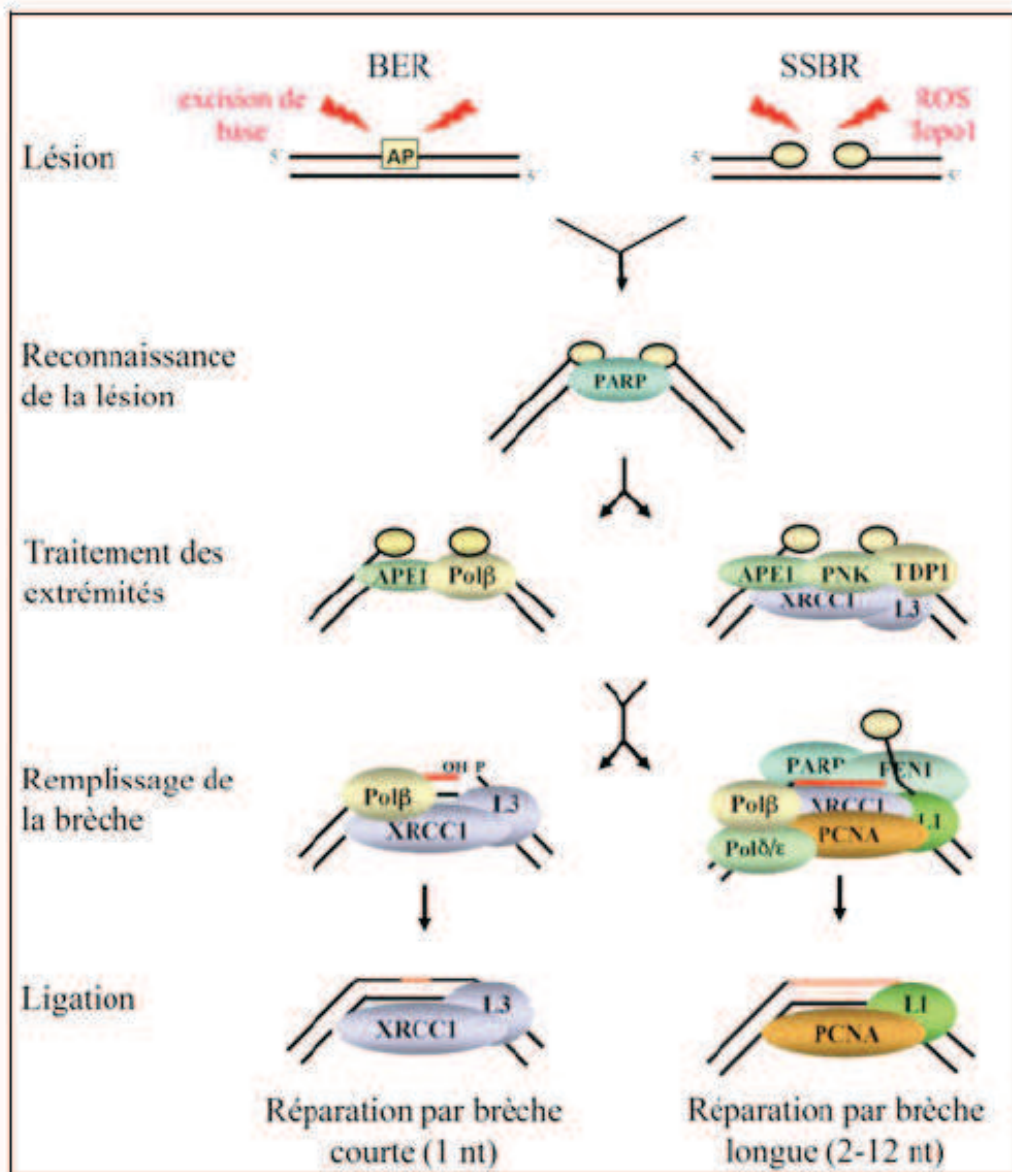


Figure 12 : schéma simplifié du mécanisme du BER/SSBR

Ce schéma illustre les 2 voies de réparation du BER/SSBR : la réparation par brèche courte et par brèche longue. Dans un premier temps, la cassure est générée soit par l'excision de base soit par des ROS ou la topoisomérase I. PARP-1 est alors capable de reconnaître la cassure qui la stimule en retour. L'activité de poly(ADP-ribosyl)ation permet le recrutement de facteurs de réparation comme XRCC1 qui joue le rôle de protéine plateforme. Ainsi, après le traitement des extrémités et le remplissage de la brèche (court ou long selon le dommage), l'ADN est reliqué par l'ADN ligase III (brèche courte) ou l'ADN ligase I (brèche longue).

Par la suite, la cassure générée peut être réparée de deux manières différentes : soit par **brèche courte** en comblant la cassure avec un seul nucléotide et en religuant le tout (fait intervenir l'ADN polymérase β , XRCC1 et l'ADN ligase III), soit par **brèche longue** quand une des extrémités n'est pas compatible pour une religation directe. Dans ce dernier cas, les ADN polymérases δ , ϵ voire β stimulées par PARP-1 et PCNA synthétisent de 2 à 12 nucléotides en déplaçant un bras en 5' appelé flap, qui sera pris en charge par FEN1 et clivé ultérieurement (**figure 12**) (Prasad et al., 2001). La ligation fait intervenir l'ADN ligase I via son interaction avec PCNA (Levin et al., 2000).

PARP-1 intervient non seulement dans l'initiation du processus en détectant la cassure et en ouvrant la chromatine, mais également tout au long du processus en interagissant avec des protéines des deux voies de réparation : XRCC1, ADN polymérase β et ADN ligase III pour la brèche courte et PCNA pour la brèche longue. Il a ainsi été montré *in vitro* que l'absence de PARP-1 diminue de moitié le processus de polymérisation dans la voie de réparation par brèche courte et réduit quasiment totalement la polymérisation dans la voie des brèches longues (Dantzer et al., 2000). PARP-1 interviendrait par ailleurs dans le choix de la voie en interagissant avec APE1 et l'ADN polymérase β (Cistulli et al., 2004; Sukhanova et al., 2010; Sukhanova et al., 2005). Enfin, PARP-1 stimule l'activité de l'ADN ligase III et donc la ligation des deux extrémités d'ADN lors du processus de réparation par brèche courte (Leppard et al., 2003). Néanmoins, certaines études récentes confirment une implication de PARP-1 dans le processus, mais semblent indiquer qu'elle n'est pas nécessaire (Godon et al., 2008; Strom et al., 2011). Il n'y a donc pas encore de consensus sur la fonction exacte jouée par PARP-1 dans le SSBR en tant que tel.

PARP-2 est également impliquée dans ce mécanisme de réparation puisque les souris PARP-2^{-/-} sont sensibles aux agents alkylants et radiations ionisantes (Schreiber et al., 2002). Il a également été montré que PARP-2 interagit avec certaines des protéines citées ci-dessus dont PARP-1, XRCC1, l'ADN polymérase β et l'ADN ligase III. Toutefois, son rôle exact n'est pas encore connu même si nous savons qu'elle est recrutée plus tardivement au site du dommage par rapport à PARP-1 et que son activité n'est pas nécessaire au recrutement de XRCC1 (Mortusewicz et al., 2007). Une étude récente a permis de montrer qu'elle interagit préférentiellement avec les structures flap même si ce sont les 5' sortants qui stimulent le plus son activité (Kutuzov et al., 2013). De plus, les auteurs montrent *in vitro* que PARP-2 est

capable de réguler les activités de FEN1 et de l'ADN polymérase β . Il semblerait également que PARP-2 régule l'activité de PARP-1 afin que cette dernière ne soit suractivée sur le site de dommage. PARP-2 ne semble toutefois pas nécessaire au bon déroulement du SSBR puisque sa déplétion dans des cellules humaines n'a que peu d'impact sur le taux de réparation (Fisher et al., 2007).

1.3.2. La réparation des cassures double-brin

Les cassures double-brin dans l'ADN peuvent avoir des conséquences désastreuses pour la cellule, c'est pourquoi leur surveillance et leur réparation sont vitales. En effet, leur persistance est à l'origine de mutations ou d'aberrations chromosomiques toutes deux pouvant favoriser le processus tumoral (Hanahan and Weinberg, 2000). Les DSB peuvent être causées par des agents exogènes comme des radiations ionisantes (rayons X ou γ) ou encore des agents chimiques (bléomycine ou néocarzinostatine) mais peuvent également provenir d'agents endogènes. C'est le cas de la topoisomérase II qui clive l'ADN pour relaxer la double-hélice et facilite ainsi la transcription, la réplication ou la recombinaison. Certains mécanismes cellulaires nécessitent la formation de DSB comme la recombinaison V(D)J dans les cellules B ou T permettant la production des chaînes lourdes des anticorps ou des récepteurs T respectivement. Enfin, la recombinaison méiotique est également génératrice de DSB que la cellule doit absolument contrôler pour éviter tout dommage irréversible.

La cellule dispose de deux mécanismes de réparation des DSB : la recombinaison homologue (HR : Homologous Recombination) qui prévaut durant les phases S/G2 du cycle cellulaire ou la recombinaison non-homologue (NHEJ : Non-Homologous End-Joining) qui a lieu durant les autres phases. Cette dernière étant plus fidèle puisqu'elle répare la liaison en fonction de la chromatide sœur (Chapman et al., 2012).

PARP-1, PARP-2 et PARP-3 jouent un rôle actif dans ces deux mécanismes en interagissant avec des protéines impliquées dans chacune des voies. Il a été montré que l'absence de PARP-1 entraîne une augmentation d'échanges entre chromatides sœurs, causée par une déficience dans la réparation des DSBs par recombinaison homologue en phase S (Schultz et al., 2003). Plus précisément, PARP-1 et probablement PARP-2 promeuvent le recrutement du complexe MRN (Mre11/Rad50/Nbs1) au niveau des DSB produites

directement après irradiation ou sur des DSB issues des fourches de réplication effondrées après traitement à l'hydroxyurée et nécessitant la résection de l'ADN (activité portée par MRN) (Bryant et al., 2009; Haince et al., 2008). En revanche, PARP-1 et PARP-2 ne semblent pas être requises dans le processus de HR lui-même.

PARP-1 et PARP-3 interviennent toutes deux dans le NHEJ dit classique et interagissent avec les protéines Ku70, Ku80 et DNA-PKcs (DNA-dependent-Protein Kinase catalytic subunit). PARP-1 stimule l'activité kinase de DNA-PKcs en la poly(ADP-ribosyl)ant et promeut ainsi une réparation efficace des DSB (Malewicz et al., 2011; Pears et al., 2012). En effet, DNA-PK est responsable de la phosphorylation du variant d'histone H2AX qui permet la signalisation du dommage. PARP-3 interviendrait elle aussi dans le NHEJ en interagissant avec plusieurs protéines dont Ku70/Ku80, DNA-PKcs, APLF et le complexe ligase IV/XRCC4 (Boehler et al., 2011; Fenton et al., 2013; Rouleau et al., 2007; Rulten et al., 2011). Son rôle n'est pas encore clairement défini mais la double déplétion de PARP-1 et PARP-3 dans les souris augmente clairement leur radiosensibilité ce qui prouve l'importance des 2 protéines dans ce processus (**figure 13**). En revanche, peu de données sont disponibles concernant PARP-2. Nous savons uniquement qu'il y a une accumulation de DSB dans les thymocytes murins déficients en PARP-2 et qu'une interaction entre PARP-2 et Ku70/80 a été observée au laboratoire (Nicolas et al., 2010). PARP-2 pourrait donc elle aussi intervenir dans le processus de NHEJ.

Troisièmement, PARP-1 intervient également dans le NHEJ dit alternatif, processus mis en évidence lorsque le NHEJ classique est invalidé, et qui met en jeu XRCC1, la DNA ligase III et l'histone H1 (Audebert et al., 2004; Rosidi et al., 2008; Wang et al., 2005).

Enfin, rappelons que PARP-1 est largement impliquée dans modulation du processus de réparation des DSB en modulant la structure de la chromatine (voir chapitre III.1.1.2.1) ou encore en modifiant localement le paysage épigénétique. En effet, une étude a récemment montré le recrutement PAR-dépendant de la déméthylase KDM4B sur les DSBs (Young et al., 2013). KDM4B promeut la réparation et la survie cellulaire en déméthylant les histones H3K9me3 qui représentent une barrière épigénétique au processus de réparation.

Les PARPs ont donc des rôles multiples dans la surveillance de l'intégrité du génome et dans sa réparation si nécessaire. En cas de dommages limités, les PARPs promeuvent la survie cellulaire en favorisant leur réparation. En revanche, si le génome est sévèrement endommagé, les PARPs et plus précisément PARP-1 va jouer un rôle actif dans la mort cellulaire et dans la voie mise en jeu.

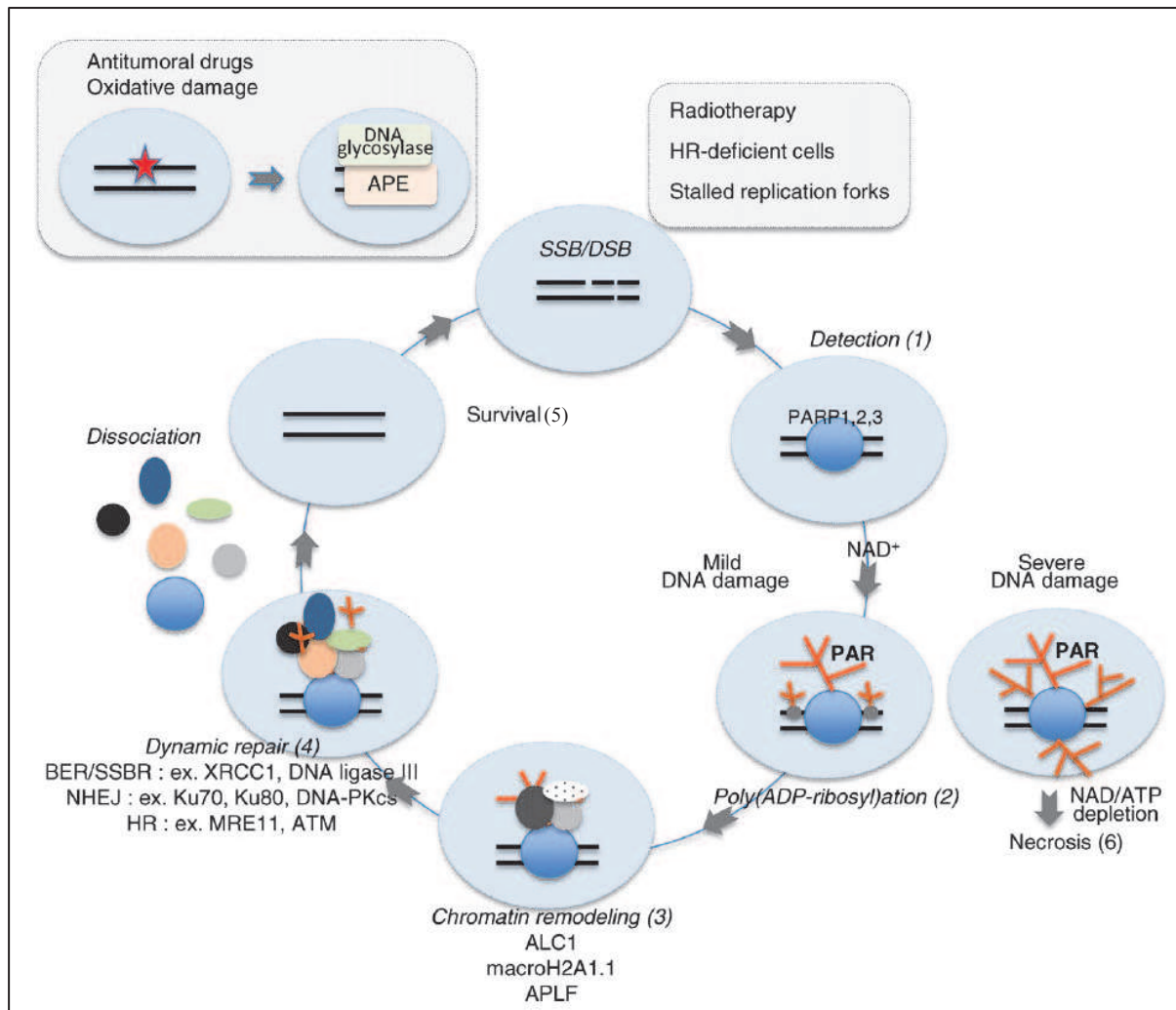


Figure 13 : schéma récapitulatif des rôles des PARPs sur le site du dommage

PARP-1, PARP-2 et PARP-3 lient rapidement les DSB ou SSB créés durant le processus de BER/SSBR ou générés par des radiations ionisantes, des fourches de réplication effondrées ou spontanément dans des cellules tumorales déficientes en réparation par recombinaison homologue (HR)¹. Les PARPs synthétisent rapidement du poly(ADP-ribose) en s'automodifiant ou en hétéromodifiant les histones², ce qui permet l'ouverture locale de la chromatine et le recrutement de facteurs de réparation ou de remodelage de la chromatine via leur domaine de liaison au PAR³⁻⁴. En cas de dommages modérés, les PARPs promeuvent ainsi la réparation et la survie cellulaire⁵. En revanche, lorsque les dommages sont sévères, la sur-activation des PARPs conduit à la déplétion de NAD⁺ et d'ATP et finalement à la mort cellulaire par nécrose⁶. D'après (De Vos et al., 2012).

2. Les PARPs dans les processus de mort cellulaire

En fonction du type de dommages, de leur intensité et de l'état cellulaire, les réponses possibles ne sont identiques. PARP-1 a été impliquée dans au moins 4 modes de mort cellulaire : l'apoptose, la nécrose dite parthanatos, l'autophagie et l'apoptose caspases-indépendante (Virag et al., 2013).

2.1. L'apoptose

L'apoptose est une mort cellulaire programmée initiée par la protéine p53 activée suite à un stress cellulaire incluant les dommages à l'ADN. Cette mort est dite « propre » car après la fragmentation de l'ADN, la cellule est conditionnée en corps apoptotiques sans rupture de la membrane plasmique et ne donne donc pas lieu à une réponse inflammatoire (Edinger and Thompson, 2004). Le relargage du cytochrome c de la mitochondrie vers le cytoplasme permet l'activation de la caspase 9 puis 3. La caspase 3 va cliver PARP-1 et PARP-2 au niveau de leur domaine N-terminal permettant de séparer le domaine de liaison à l'ADN du domaine catalytique (Oliver et al., 1998). Ce clivage va permettre l'inactivation des PARPs qui ne détecteront pas les cassures créées dans l'ADN lors du processus d'apoptose. En effet, si tel était le cas, les PARPs seraient suractivées par la présence accrue de cassures dans l'ADN et synthétiseraient massivement du PAR. Or, ceci conduirait à la nécrose cellulaire et donc à un phénomène d'inflammation locale (voir ci-dessous).

De plus, comme mentionné plus haut, PARP-1 agit comme co-activateur transcriptionnel de NF- κ B (Nuclear Factor- κ B) en liant les promoteurs de gènes cibles en réponse à divers stimuli inflammatoires (Oliver et al., 1999). Elle peut ainsi également favoriser l'apoptose (Hassa et al., 2005). Enfin, une autre étude a montré l'implication de PARP-1 dans la régulation de plusieurs gènes régulant l'apoptose : Bcl10, c-Rel et TRAIL-R1 et -R2 (tumor necrosis factor (TNF)-related apoptosis-inducing ligand receptor-1 and -2) (Cohausz and Althaus, 2009). PARP-1 ne jouerait toutefois pas un rôle actif dans l'exécution du processus apoptotique une fois les caspases activées. Le clivage de PARP-1 est aujourd'hui principalement utilisé comme marqueur apoptotique.

2.2. La nécrose induite par PARP-1

La sur-activation des PARPs conduit à la synthèse démesurée de PAR et à une déplétion progressive en NAD^+ dans la cellule. Or, le NAD^+ est un cofacteur essentiel de plusieurs enzymes du métabolisme énergétique cellulaire. A terme, le manque de NAD^+ entrainera une diminution d'ATP disponible. L'ATP étant nécessaire au processus d'apoptose, la cellule est conduite à la mort par nécrose. Ce modèle de mort par suicide a été proposé pour la première fois par Berger (Berger, 1985). La théorie a été depuis vérifiée grâce à l'effet protecteur qui a été observée en l'absence de PARP-1 ou après son inhibition. En effet, la viabilité cellulaire était augmentée même en présence d'agents induisant la nécrose (Heeres and Hergenrother, 2007).

2.3. L'apoptose caspases-indépendante

Dans certains cas, PARP-1 est également à l'origine d'une autre forme de mort cellulaire appelée parthanatos en référence à Thanatos, la personnification de la mort dans la mythologie grecque. En effet, il a été montré que dans le cas de dommages cérébraux induits par une attaque vasculaire cérébrale ou une ischémie, PARP-1 est capable d'activer une apoptose indépendante des caspases. En fait, PARP-1 est stimulée par les dommages causés à l'ADN et le PAR libre qui résulte de son activité enzymatique va entraîner la délocalisation d'une flavoprotéine mitochondriale appelée AIF (Apoptosis Inducing Factor) (Wang et al., 2011). En conditions physiologiques, AIF est impliquée dans la phosphorylation oxydative et le maintien de la structure mitochondriale (Wang et al., 2009). Une fois délocalisée dans le noyau, AIF va entraîner la condensation de la chromatine, la fragmentation de l'ADN et *in fine* la mort cellulaire (Yu et al., 2002). Des études sont encore nécessaires afin de comprendre le mécanisme permettant la sortie d'AIF de la mitochondrie, mais il se pourrait que le PAR induit une dépolarisation de la membrane mitochondriale du fait de son électronégativité (Andrabi et al., 2006).

2.4. L'autophagie

La macroautophagie ou l'autophagie définit un processus nécessaire à l'homéostasie cellulaire, à travers lequel la cellule est alors capable de « manger » ses propres composants (macromolécules ou organelles) via les lysosomes. Ce processus permet à la cellule en période de stress cellulaire (hypoxie, dommages à l'ADN, ROS, stress du réticulum endoplasmique) de maintenir son homéostasie énergétique et nutritive. (Virag et al., 2013).

PARP-1 est impliquée dans l'autophagie induite par une carence nutritionnelle via l'activation de AMPK (AMP-activated protein Kinase et l'inhibition de mTOR (mammalian Target Of Rapamycin) à travers une boucle amplificatrice. En effet, les carences stimulent une première fois le processus d'autophagie, mais induisent en outre des dysfonctionnements mitochondriaux et la formation de ROS qui vont créer des dommages dans l'ADN et activer PARP-1. La suractivation de PARP-1 entraînent la sur-consommation de NAD^+ et la diminution d'ATP, ce qui active l'AMPK et inhibe mTOR. En absence de PARP-1 ou en cas d'inhibition, cette boucle ne fonctionne plus et la mort par apoptose est privilégiée (Rodriguez-Vargas et al., 2012). En effet, une étude a montré que l'induction de l'autophagie en réponse aux dommages dans l'ADN est réduite quand PARP-1 est inhibée, en partie parce que mTOR n'est pas assez inhibée (Munoz-Gamez et al., 2009).

3. Les PARPs dans la division cellulaire

De nombreuses études ont pointé du doigt l'importance des PARPs et du PAR dans le processus de division cellulaire. En effet, des études ont montré l'augmentation du PAR intracellulaire au moment de la mitose, tandis qu'une forte concentration en PAR est détectée au niveau du fuseau mitotique et des microtubules chez *Xenopus laevis* (Chang et al., 2004). Dans un premier temps, il faut noter que la tankyrase 1 agit de concert avec PARP-3 sur le fuseau mitotique lors de la mitose. Leur collaboration permet de moduler le degré de poly(ADP-ribosyl)ation de NuMA (Nuclear Mitotic Apparatus protein 1) qui est une protéine de la matrice nucléaire impliquée dans l'établissement et le maintien du fuseau mitotique. La déplétion d'une des deux PARPs induit des délais dans la progression mitotique voire des défauts de ségrégation des chromosomes pouvant conduire à la mort cellulaire (Boehler et al., 2011; Chang et al., 2005). De plus, la tankyrase 1 intervient également dans la formation et le

maintien des centrosomes en modulant l'activité de la protéine Miki ou en stabilisant la protéine CPAP (Centrosomal P4.1 Associated Protein).

Enfin, PARP-1 et PARP-2 sont toutes deux également liées aux centromères où elles interagissent avec les protéines du kinétochore CENPA et CENPB (CENtromere Protein A/B) mais aussi avec la protéine du point de contrôle mitotique Bub3 (Saxena et al., 2002a; Saxena et al., 2002b). Les PARPs contrôlent ici la formation du kinétochore et l'arrimage des microtubules sur cette structure.

4. PARPs : maladies et thérapies

PARP-1 est largement impliquée dans les processus de survie et de mort cellulaire. Ainsi, elle promeut la survie cellulaire en présence de faibles dommages à l'ADN et à l'inverse elle module la mort cellulaire en cas de dommages irréversibles. De nombreuses études ont montré que l'activation de PARP-1 peut contribuer dans certaines maladies à la formation de lésions tissulaires (Luo and Kraus, 2012). En effet, l'inhibition de PARP-1 a un effet protecteur dans le cas de diverses maladies inflammatoires aiguës ou chroniques comme l'ischémie cardiaque ou cérébrale, le diabète induit par la streptozotocine ou encore le choc septique induit par le LPS (LipoPolySaccharide) (Burkart et al., 1999; Mabley et al., 2001). Comme PARP-1 intervient en tant que co-régulateur des facteurs de transcription NF- κ B et AP-1, il en résulte une synthèse accrue de facteurs pro-inflammatoires comme iNOS (Hassa et al., 2003; Hassa et al., 2005; Oliver et al., 1999). L'enzyme iNOS produit elle en retour des oxydes nitriques et des radicaux hydroxyles qui vont fortement endommager l'ADN. Les cassures dans l'ADN vont stimuler PARP-1 et conduire à une mort par parthanatos.

Dans les années 1980, les structures des premiers inhibiteurs PARP découverts étaient basées sur le nicotinamide et le membre le plus connu est le 3-aminobenzamide. Il a permis de montrer la cytotoxicité de l'inhibition de PARP-1 dans les cellules prolifératives traitées avec des agents génotoxiques (Curtin, 2005). L'inhibition des PARPs en thérapie a donc un réel intérêt aussi bien en thérapie cancéreuse que dans d'autres maladies de type inflammatoire avec comme point central les dommages à l'ADN (**figure 14**). Dans le traitement anti-cancéreux, l'inhibition de PARP-1 permet d'augmenter le stress génotoxique induit par la chimiothérapie ou la radiothérapie afin de conduire les cellules vers l'apoptose.

Dans le cas de certaines maladies, l'inhibition de PARP-1 permet de réduire la formation de facteurs inflammatoires et promeut ainsi la survie cellulaire (Curtin and Szabo, 2013). Par exemple, l'administration d'inhibiteurs PARP permet d'augmenter l'effet antiprolifératif du témozolomide (agent méthylant de l'ADN prescrit dans le cas de mélanomes métastatiques), des radiations ionisantes ou encore d'inhibiteurs anti topoisomérase I dans des cellules humaines ou des xéno greffes chez la souris (Calabrese et al., 2004). Les inhibiteurs PARP permettent également de traiter spécifiquement des cellules tumorales déficientes dans les suppresseurs de tumeurs BRCA1 ou BRCA2, qui jouent toutes deux un rôle important dans le DSBR par le HR (**figure 14**). En effet, les SSB non réparés en présence d'inhibiteur PARP sont convertis en DSB durant la réplication. Comme le HR est déficient, ces DSB ne sont pas prises en charge, ce qui augmente le stress génotoxique cellulaire (Bryant et al., 2005; Farmer et al., 2005).

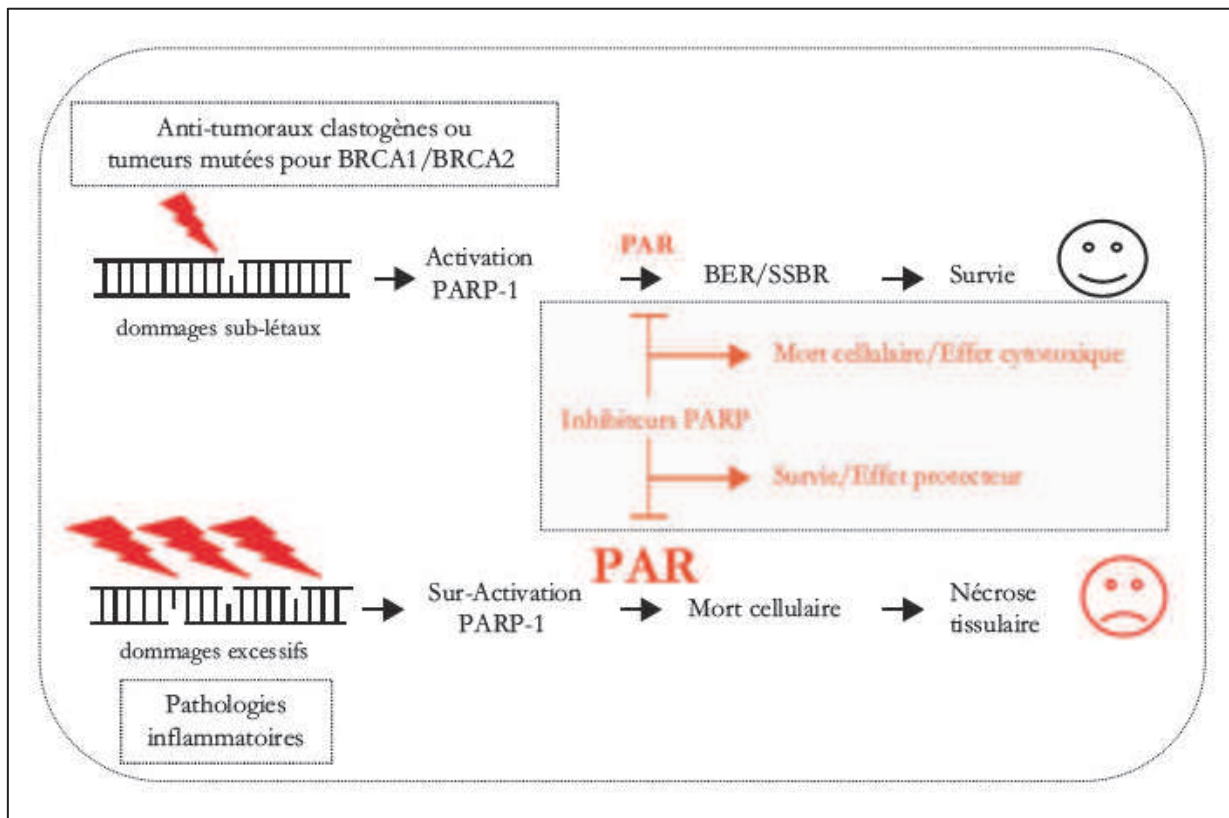


Figure 14 : l'intérêt thérapeutique de l'inhibition des PARPs

Schéma illustrant la stratégie thérapeutique sous-tendant l'utilisation des inhibiteurs PARP. En réponse à des doses sublétales de dommages induits par des anti-tumoraux ou en réponse à des cassures spontanées qui s'accumulent dans des cellules déficientes en BRCA1 ou BRCA2, l'activation de PARP-1 promeut la réparation et la survie cellulaire. Son inhibition va donc induire l'arrêt du cycle cellulaire et la mort par apoptose. Dans le cas de maladies inflammatoires aiguës ou chroniques, la quantité importante de dommages sur-active PARP-1 et le PAR massivement produit entraîne la mort cellulaire par parthanatos, nécrose ou autophagie. Son inhibition assure dans ce cas un effet protecteur.

Plusieurs inhibiteurs PARP sont actuellement en cours d'essais cliniques mais à des phases différentes (<http://clinicaltrials.gov/ct2/home>). Pour plus d'informations nous vous renvoyons vers des revues récentes (Curtin and Szabo, 2013; Dantzer et al., 2011). Etant donné le spectre assez large des inhibiteurs PARP, il reste énormément de travail à réaliser afin de comprendre la contribution des PARPs autre que PARP-1 dans les mécanismes mis en jeu. Enfin, en vue de leur administration aux patients, il faut intensifier les recherches sur les PARPs et leurs fonctions cellulaires ou physiologiques afin de mieux appréhender l'impact des traitements, que ce soit en effets désirés ou non-désirés.

IV. HMG2L1, une nouvelle protéine à HMGbox

HMG2L1 (High-Mobility Group protein 2-like 1) est une protéine de 601 acides aminés appartenant à la famille des protéines à boîte HMG (High-Mobility Group ou HMGbox). Ce domaine protéique d'environ 70 acides aminés est décrit comme pouvant interagir fortement avec l'ADN. Excepté ce HMGbox, la protéine ne contient aucun autre domaine répertorié dans les bases de données. Au niveau fonctionnel, seules quelques études réalisées depuis une dizaine d'années permettent de dessiner une fonction principale d'HMG2L1 : la régulation de la transcription des gènes.

1. Les protéines à domaine HMG

La superfamille des protéines HMG peut être subdivisée en 3 groupes distincts qui diffèrent sur le plan structural : HMGN (HMG-Nucleosome binding family) qui contient un domaine de liaison au nucléosome, HMGA (HMG-AT hook family) qui contient un domaine AT-hook et HMGB (HMG-Box family) qui contient un domaine HMG. La protéine HMG2L1 appartient à ce dernier groupe (Stros et al., 2007).

Il existe plus d'une quarantaine de protéines humaines contenant au moins 1 domaine HMGbox. Ces protéines sont classées en 2 groupes : le groupe A qui contient les protéines avec en général plus de 2 HMGbox et une queue C-terminale acide, qui interagissent avec l'ADN de manière séquence-indépendante et qui interviennent dans la structuration et le remodelage de la chromatine ; le groupe B qui contient les protéines à 1 seul HMGbox, qui reconnaissent l'ADN de manière séquence spécifique et qui sont majoritairement des facteurs de transcription (Stros et al., 2007).

Les structures tridimensionnelles de plusieurs domaines HMG ont été obtenues par RMN, et le repliement forme un L composé de 3 hélices α constituant les 2 bras (bras court : hélice I et II, bras long : hélice III et extension N-terminale). Il y a un angle de 80° entre les deux bras (**figure 15**). Ce domaine interagit au niveau du petit sillon de l'ADN et induit une torsion qui peut varier de 60 à 110° selon les protéines (Stros, 2010).

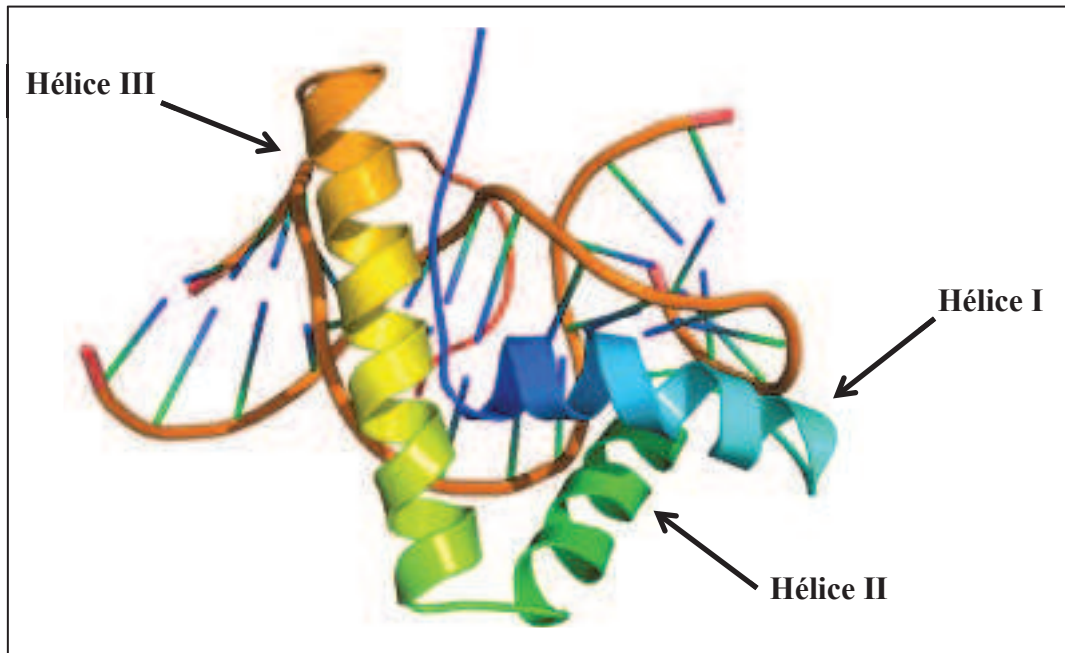


Figure 15 : structure tridimensionnelle du domaine HMG en association avec l'ADN
 Structure obtenue par RMN et montrant l'interaction du domaine HMG de la protéine humaine LEF-1 avec le petit sillon de l'ADN. Les couleurs vont graduellement du bleu (N-terminal) vers le rouge (C-terminal) du domaine (Fichier PDB : 2LEF).

2. HMG2L1

2.1. Description générale

Le gène codant pour HMG2L1 a été décrit pour la première fois en 1999, il est situé sur le locus chromosomique 22q13.1 et il est composé de 12 exons, néanmoins l'ARN messager qui code pour HMG2L1 pleine longueur n'est composé que de 11 exons. Il existerait quatre isoformes plus courtes dérivant du processus d'épissage alternatif, cependant aucune preuve expérimentale n'est disponible.

La protéine HMG2L1 comporte 601 acides aminés dont une forte proportion de lysine comparé aux autres protéines (15%), ce qui lui confère un point isoélectrique de 10. Elle est localisée dans le noyau, puisqu'une étude a montré par immunofluorescence la localisation nucléaire des fusions HMG2L1-RFP ou HMG2L1-myc dans des fibroblastes ou des cellules de muscle lisse (Zhou et al., 2010). Concernant sa structure modulaire, elle ne contient qu'un seul domaine répertorié qui est le HMGbox, localisé entre les acides aminés 407 et 475 (voir partie Résultats, **figure 24**).

2.2. Les fonctions connues de HMG2L1

2.2.1. Régulateur de la voie Wnt

La voie Wnt est une voie de signalisation cellulaire impliquée majoritairement dans les processus de différenciation et de polarité cellulaires mais aussi lors de l'embryogenèse. De nombreux liens ont été décrits entre la voie Wnt et certaines maladies neurodégénératives ou certains cancers. Il existe plusieurs voies en fonction des récepteurs et corécepteurs avec lesquels va interagir les différentes protéines Wnt qui sont secrétées (Niehrs, 2012). La voie qui nous intéresse est dépendante de la β -caténine. Cette protéine est séquestrée dans le cytoplasme par un complexe de destruction composé notamment de l'axine et de GSK3 (Glycogen Synthase Kinase 3) qui envoie la β -caténine vers le protéasome. L'activation de la voie décompose le complexe de destruction et libère la β -caténine qui s'accumule dans le noyau pour activer transcriptionnellement divers gènes cibles. Pour ce faire, elle interagit avec 2 familles de facteurs de transcription nommées LEF (Lymphoid Enhancer-binding Factor) et TCF (T-Cell Factor), qui sont eux-mêmes des protéines à domaine HMG. Cette voie agit particulièrement dans des processus de différenciation et prolifération cellulaires, ses dérèglements pouvant de fait favoriser les processus cancéreux (MacDonald et al., 2009).

HMG2L1 intervient dans cette voie chez *Xenopus laevis*, comme le décrit une des premières études qui a été publiée la concernant (Yamada et al., 2003). Il a été montré que HMG2L1 interagit avec la protéine NLK (Nemo-Like Kinase) qui inhibe la voie Wnt/ β -caténine en phosphorylant les facteurs de transcription TCF/LEF-1 dont l'activité transcriptionnelle est alors diminuée. HMG2L1 intervient également en tant que co-régulateur négatif mais l'étude ne permet pas de savoir à quelle étape elle intervient. Cependant, les auteurs suggèrent qu'elle pourrait entraver la formation du complexe TCF/LEF-1- β -caténine ou sa liaison au promoteur et ainsi diminuer la transcription des gènes sous la dépendance de cette voie (**figure 16**). Ce n'est pas étonnant de voir une protéine HMG intervenir dans cette voie, en effet LEF/TCF contient également ce domaine, de même que l'autre répresseur transcriptionnel qu'est HBP1 (HMG-Box Protein 1). De nombreux membres de la famille Sox (SRY related) interviennent également dans la voie à différents endroits : maintien de la β -caténine dans le cytoplasme, répresseur transcriptionnel, ...

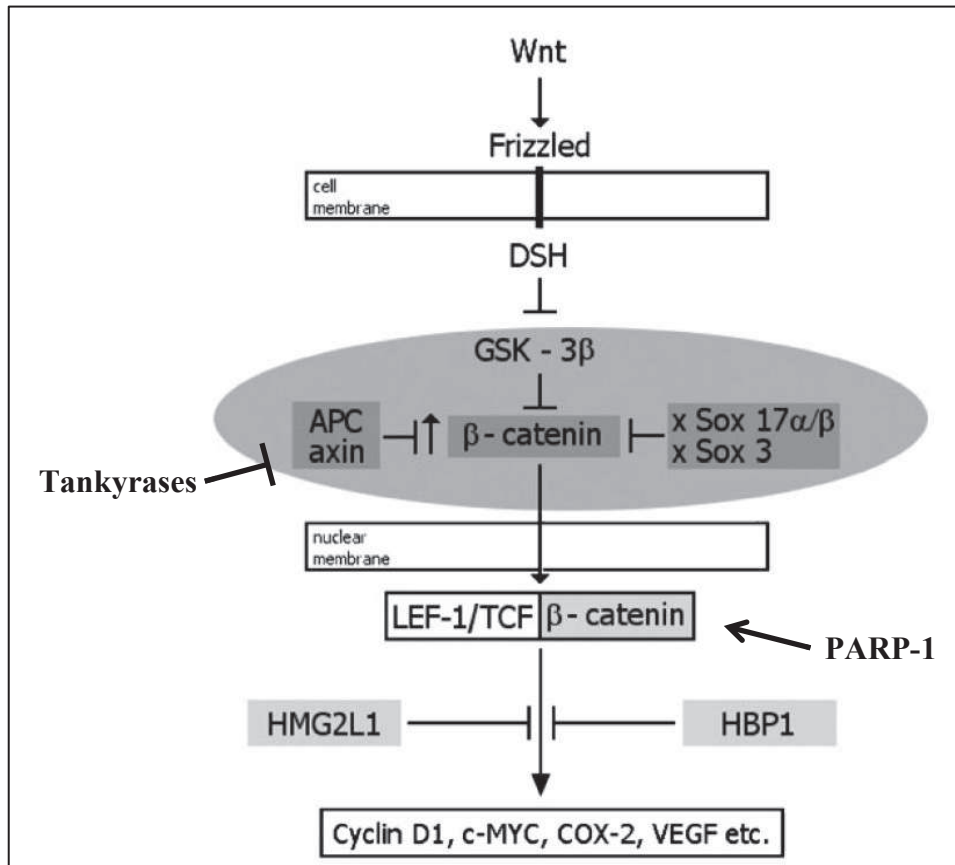


Figure 16 : les PARPs et les protéines HMG dans la voie Wnt/β-caténine

Schéma illustrant la voie Wnt/β-caténine et l'action des protéines à HMG : Sox 17α/β et Sox 3 inhibent l'accumulation de la β-caténine dans le noyau, HMG2L1 et HBP1 puis LEF-1/TCF qui sont respectivement régulateurs transcriptionnels négatifs et positifs. Les tankyrases activent la voie en augmentant l'accumulation nucléaire de la β-caténine, quant à PARP-1 elle est activateur transcriptionnel de la voie. Adapté de (Stros et al., 2007).

Certaines PARPs sont également impliquées dans la régulation de la voie Wnt/β-caténine. C'est le cas des tankyrases (paragraphe II.3) et de PARP-1. Les tankyrases peuvent poly(ADP-ribosyl)er l'axine qui est alors poly-ubiquitylée et conduite vers le protéasome pour être dégradée (Zhang et al., 2011). Ceci libère donc la β-caténine qui va pouvoir s'accumuler dans le noyau et activer transcriptionnellement les gènes cibles. En ce qui concerne PARP-1, elle entre en compétition avec la protéine Ku70 – également impliquée dans la réparation des DSBs et interagissant avec PARP-1 – pour le complexe β-caténine/TCF-4 (Idogawa et al., 2007). PARP-1 stimule l'activité transcriptionnelle de ce complexe à l'inverse de Ku70. Les auteurs montrent également que l'induction de dommages dans l'ADN conduit à l'autopoly(ADP-ribosyl)ation de PARP-1 qui n'interagit plus avec ce complexe, diminuant ainsi l'activité transcriptionnelle du complexe.

En outre, une autre étude a montré que PARP-1 est surexprimée dans les premières étapes de la carcinogénèse colorectale en compagnie d'autres gènes comme celui de la β -caténine ou c-myc. De plus, la grosseur de la tumeur est fortement corrélée à la surexpression de PARP-1 (Nosho et al., 2006).

2.2.1. Régulateur de la différenciation des muscles lisses

Une seconde étude a permis de décrire un autre rôle de HMG2L1, dans la différenciation des muscles lisses chez les mammifères (Zhou et al., 2010). En effet, HMG2L1 intervient dans ce processus en interagissant avec la myocardine ce qui entrave son interaction avec SRF (Serum Response Factor) et la liaison du complexe sur les promoteurs de gènes cibles spécifiques du muscle lisse. Les auteurs montrent que la surexpression de HMG2L1 dans des cellules humaines du muscle lisse atténue la transcription de gènes spécifiques à ce tissu. Comme c'est le cas dans la voie Wnt, HMG2L1 semble donc agir comme répresseur transcriptionnel. Une autre protéine à domaine HMG intervient également dans ce processus, SSRP1 (Structure Specific Recognition Protein 1) interagit avec SRF et stimule son activité co-transcriptionnelle.

2.2.2. HMG2L1 appartient à un complexe de remodelage de la chromatine

Deux autres études ont permis de placer HMG2L1 dans le complexe de remodelage de la chromatine NURF (NUcleosome Remodeling Factor) appartenant à la famille ISWI. NURF comprend plusieurs sous-unités dont SNF2H (Sucrose NonFermenting protein 2 Homolog) qui porte l'activité enzymatique de type ATPase et BPTF (Bromodomain PHD-finger Transcription Factor), qui reconnaît H3K4me3 grâce à son domaine PHD (Plant HomeoDomain) et permet donc l'attachement du complexe à la chromatine. Il a été montré que HMG2L1 fait partie du complexe NURF en interagissant fortement avec BAP18 (BPTF-Associated Protein of 18kDa) (Vermeulen et al., 2010). Cette appartenance au complexe NURF a été validée par une seconde étude qui a cherché à comprendre le rôle de NURF dans l'activation hormonale de la transcription (Vicent et al., 2011). Les auteurs montrent que HMG2L1 est recrutée comme les autres sous-unités de NURF sur le promoteur du gène progestérone-dépendant dans la minute qui suit le traitement hormonal. En effet, il se trouve

que la déplétion de SNF2H ou BPTF entrave ce recrutement, démontrant que le complexe doit exister pour que HMG2L1 puisse lier le promoteur. Le complexe NURF intervient pour déplacer l'histone H1 et ouvrir la chromatine, afin de permettre l'action d'autres complexes et l'activation de la transcription du gène. Dans ce contexte, HMG2L1 semble agir comme un co-activateur transcriptionnel à travers le complexe NURF, cependant ce dernier peut également agir comme co-répresseur dans certaines situations (Corona and Tamkun, 2004).

2.2.3. Activateur du transposon sleeping-beauty

La dernière étude sur HMG2L1 a permis de montrer son intervention dans la transcription du transposon Sleeping Beauty, dont l'utilisation potentielle en thérapie génique est à l'origine des recherches le concernant (Walisko et al., 2008). Un transposon est un segment d'ADN qui peut changer de localisation dans un génome. HMG2L1 est capable d'activer la transcription de la SB transposase en se liant à une séquence d'ADN de 65 paires de bases en 5' du gène. En retour, les auteurs montrent que la SB transposase entrave l'action co-activatrice de HMG2L1 dans un processus de contrôle rétroactif, et ce en interagissant avec HMG2L1 au niveau de son domaine N-terminal en amont du domaine HMG.

En conclusion, HMG2L1 apparaît comme un régulateur transcriptionnel aussi bien répresseur qu'activateur selon les cas. Il n'est pas considéré à proprement parler comme un facteur de transcription puisqu'il interviendrait surtout à travers un complexe de remodelage de la chromatine ou comme co-régulateur, c'est-à-dire qu'il accompagne ou réprime la liaison du facteur de transcription au promoteur. Cependant, son domaine HMG lui permet d'interagir directement avec l'ADN mais vraisemblablement de manière séquence-indépendante, ce qui conférerait à HMG2L1 la possibilité de s'ancrer à la chromatine.

V. Le nucléole, centre de synthèse du ribosome

1. Structure du nucléole

Le nucléole est un organite du noyau des cellules eucaryotes qui contient l'ADN ribosomique et qui organise la synthèse des ribosomes, macromolécules essentielles à la synthèse protéique. Entre 1 à 2 millions de ribosomes sont nécessaires par génération cellulaire, ce qui demande une transcription active des ~400 gènes ribosomaux répétés en tandem et disséminés sur les 5 chromosomes acrocentriques chez l'homme (13, 14, 15, 21 et 22). Ceux-ci sont organisés en NORs (Nucleolar Organizer Regions) et permettent la reformation du nucléole après chaque mitose (Boisvert et al., 2007). Le nucléole est composé de 3 régions différentes : le **centre fibrillaire** contient les gènes d'ADNr qui sont transcrits à l'interface avec le **composant dense fibrillaire**. Enfin, l'assemblage des deux sous-unités 40s et 60s du ribosome a lieu dans le **composant granulaire** à partir des ARNr et des protéines ribosomales importées depuis le noyau. Les sous-unités sont ensuite exportées vers le cytoplasme où elles s'assembleront pour donner lieu à un ribosome complet et fonctionnel (**figure 17**).

2. La transcription

Les gènes d'ADNr sont transcrits par l'ARN polymérase I (ARN pol I) en un pré-ARNr appelé 47s (S : unités Svedberg donnant son coefficient de sédimentation) qui générera après maturation les ARN ribosomaux 5.8s, 18s et 28s. Le ribosome contient également un autre ARN nommé 5s, mais celui-ci est transcrit par l'ARN polymérase III avant d'être importé dans le nucléole pour l'assemblage.

Brièvement, il faut l'action simultanée du facteur de transcription UBF (Upstream Binding Factor) et du complexe SL1 (constitué de TBP (TATA-Binding Protein) et de 4 TAF_I (TBP-Associated Factor RNA polymerase I-specific)) pour activer la transcription. Ce sont les TAF_I qui permettent l'interaction de l'ARN pol I avec le promoteur du gène. L'ARN pol I est elle liée à de nombreux autres facteurs : protéine kinase CK2, l'actine nucléaire, la myosine 1 nucléaire et des protéines modificatrices de la chromatine (G9a et SIRT7). Elle interagit également avec des facteurs de réplication et de réparation comme les

topoisomérase I et II, PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen), Ku70/80 ou encore TFIIH (Transcription Factor IIIH) (**Figure 18**).

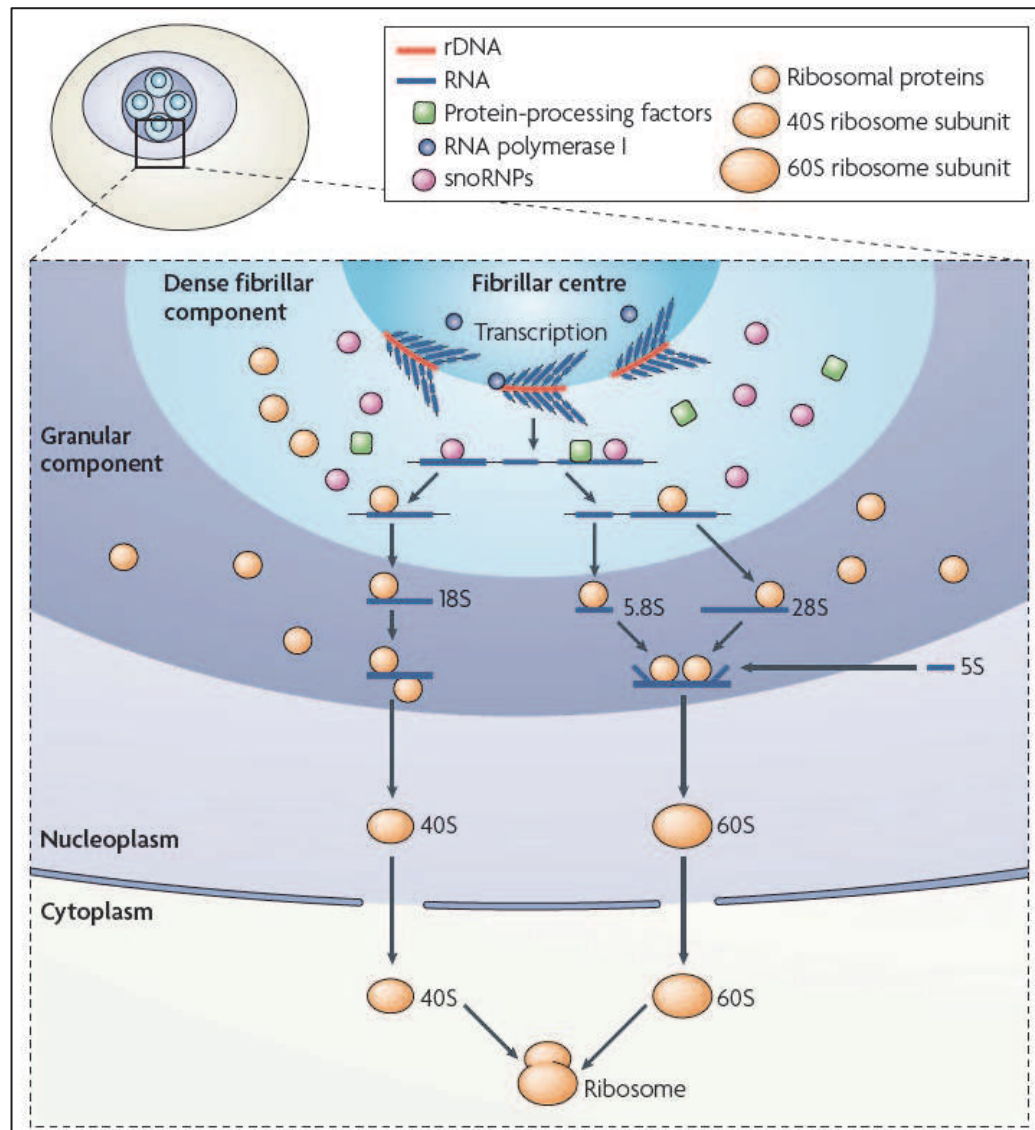


Figure 17 : la structure du nucléole et l'assemblage du ribosome

Schéma illustrant les étapes de la biogenèse des ribosomes en fonction du compartiment nucléolaire. En premier lieu, la transcription se déroule à l'interface entre le centre fibrillaire et le composant dense fibrillaire par l'ARN pol I. Durant la transcription, les ARNr naissant sont de suite pris en charge par des facteurs de maturation (small nucleolar ribonucleoproteins (snoRNPs)) ou protein-processing factors) dans le composant dense fibrillaire. Le pre-ARNr 45s donne lieu aux ARNr 18s, 5,8s et 28s après maturation. Dès que ces derniers sont générés, ils lient les premières protéines ribosomales qui sont importées depuis le cytoplasme après leur traduction. L'ARNr 5s est importé depuis le noyau car transcrit par l'ARN pol III. Les deux sous-unités du ribosome 40s et 60s sont assemblées dans le composant granulaire avant d'être exportées vers le cytoplasme où elles s'assembleront en ribosome fonctionnel. D'après (Boisvert et al., 2007)

UBF est une protéine à domaines HMG qui intervient spécifiquement dans la transcription des ADNr. Elle interagit avec l'ADN grâce à 4 de ses 6 domaines HMG et induit la formation d'une structure proche du nucléosome (en formant une boucle d'environ 140 paires de bases) (Putnam et al., 1994; Stefanovsky et al., 2001). Cette boucle permet de rapprocher spatialement le promoteur (CORE) et une région de contrôle en amont (UCE), ce qui favorise la mise en place du complexe d'initiation de la transcription (**Figure 18**). D'autre part, il a été montré que UBF interagit avec les nucléosomes en lieu et place de l'histone H1, c'est-à-dire au niveau de l'ADN linker (Kermekchiev et al., 1997). De fait, la présence d'UBF empêche l'histone H1 de se fixer et de compacter la chromatine en une fibre de 30nm transcriptionnellement inactive. Des expériences de ChIP-Seq ont ainsi montré la présence de UBF sur les gènes d'ADNr actifs, tant sur le promoteur que sur la région transcrite (O'Sullivan et al., 2002). A l'inverse, c'est l'histone H1 qui compose la chromatine des gènes d'ADNr non transcrits.

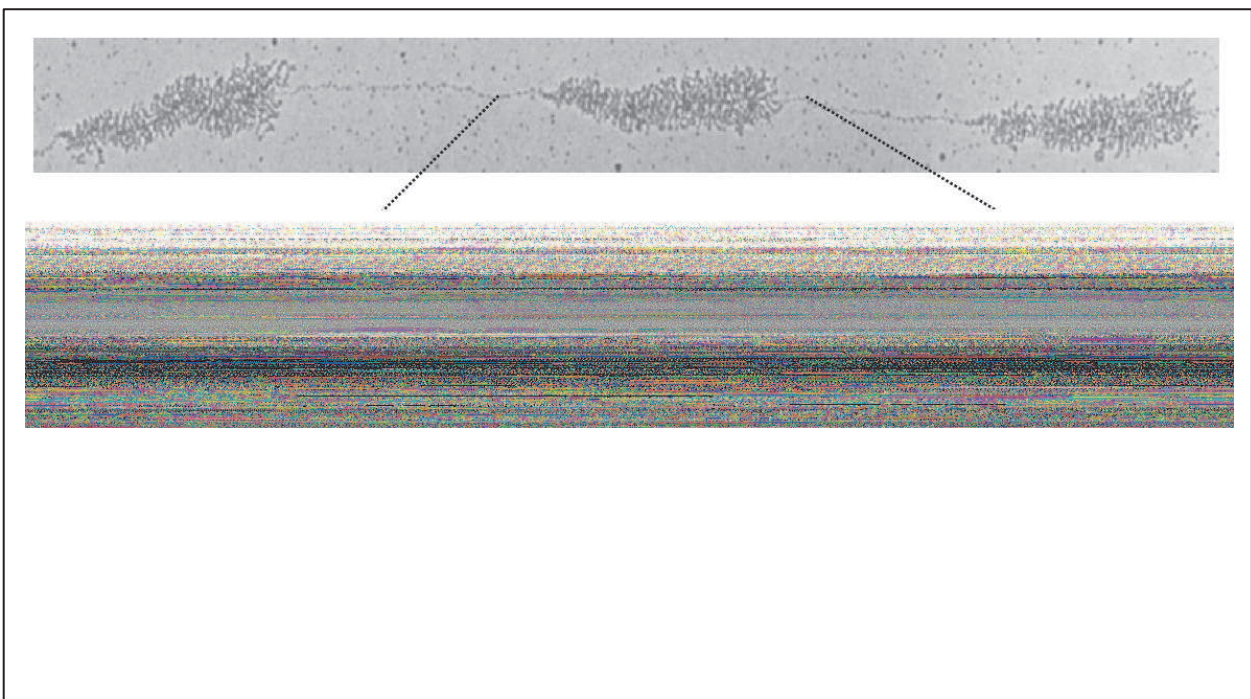


Figure 18 : structure du complexe de transcription sur le promoteur du gène ADNr

Schéma illustrant la formation du complexe de préinitiation de la transcription de l'ARN pol I sur la région promotrice des gènes d'ADNr. L'image du haut prise par microscopie électronique montre la transcription active des ADNr chez les amphibiens. Le schéma du milieu illustre l'organisation d'un gène avec la région codant le pré-ARNr sous promoteur noir, tandis que le promoteur rouge permet la transcription de la région en amont du gène qui donnera naissance au pRNA. Les boîtes rouges correspondent aux régions terminatrices de transcription fixant la protéine TTF1. Les boîtes bleues illustrent les régions enhancers entre les deux promoteurs. Enfin, le schéma du bas montre un agrandissement de la région promotrice avec la fixation des facteurs de transcription UBF et SL1 permettant l'arrivée de l'ARN pol I et de ses facteurs associés. D'après (Grummt, 2010).

Enfin, la protéine TTF1 (Termination Transcription Factor 1) lie les régions terminatrices (T₀ et T₁₋₁₀) et permet l'arrêt de la transcription par l'ARN pol I ainsi que le blocage de la fourche de réplication (Gerber et al., 1997; Grummt et al., 1986).

La prolifération cellulaire est fortement liée à la synthèse protéique et donc au nombre de ribosomes disponibles, ce qui signifie que le nucléole peut être vu comme le centre de contrôle de la prolifération. Une régulation fine de la biogenèse des ribosomes est donc nécessaire à chaque instant et de fait, toutes les voies de signalisation dépendantes des facteurs de croissance ou des nutriments disponibles affectent directement la transcription des ARNr.

3. Le contrôle de la transcription des ADNr

La transcription des ADNr est la première étape de la biogenèse des ribosomes, or comme celle-ci a un impact direct sur la prolifération et la vie cellulaires, une fine régulation est nécessaire afin d'éviter tout dérèglement. Le premier niveau de contrôle de la transcription consiste à moduler le nombre de gènes transcriptionnellement actifs dans la cellule. Ainsi, il a été montré qu'en moyenne seule la moitié des gènes d'ADNr sont transcrits, l'autre moitié ayant été mise sous silence via l'hétérochromatinisation de la chromatine. Ce mode de régulation est dit à long-terme puisqu'il demande une importante restructuration de la chromatine et qu'il intervient surtout lors des phases de développement ou de différenciation (Drygin et al., 2010) et **figure 19**).

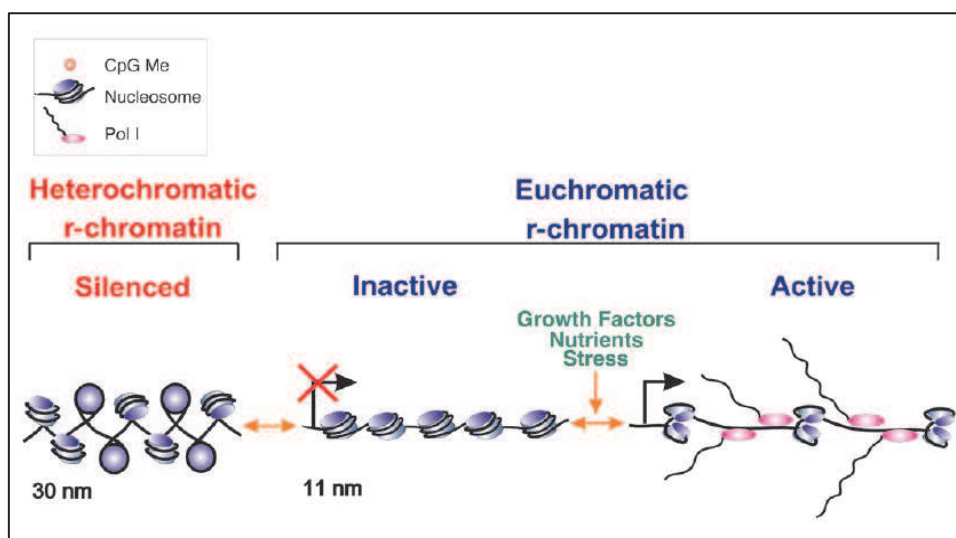


Figure 19 : la modulation de la transcription des ADNr
D'après (Sanij and Hannan, 2009).

Parallèlement, il est possible de moduler l'expression à court-terme en jouant sur le taux de transcription via la modification post-traductionnelle des facteurs de transcription. Ce mode de régulation permet de répondre rapidement aux changements environnementaux tels que les variations de nutriments et/ou facteurs de croissance disponibles.

3.1. Le contrôle épigénétique de la transcription

Afin de moduler le niveau de condensation de la chromatine, il a été montré que les modifications épigénétiques jouent un rôle important. Dans le cas de l'ADNr, plusieurs sites CpG sont méthylés mais un situé au niveau de la région du promoteur est suffisant pour mettre sous silence le gène (position -133). Cette méthylation entrave la fixation d'UBF et donc la venue du complexe de transcription (Santoro and Grummt, 2001). La déplétion de UBF par siRNA entraîne la mise sous silence d'environ 40% de gènes d'ADNr en plus des 50% déjà éteints (Sanij et al., 2008). Il ne subsiste donc que 10% de gènes d'ADNr qui sont transcriptionnellement très actifs pour combler le nombre manquant de gènes transcrits. La cellule joue dans ce cas sur le taux de transcription pour palier la diminution du nombre de gènes actifs.

C'est le complexe NoRC (Nucleolar Remodeling Complex) qui est impliqué dans l'hétérochromatinisation des gènes d'ADNr éteints (Guettg et al., 2010). Il contient les protéines SNF2h à activité ATPase et TIP5 (TTF1-Interacting Protein 5) ainsi qu'un petit ARN non codant de 150-200 nucléotides appelé pRNA. Ce dernier est transcrit à partir d'un autre promoteur de l'ARN pol I situé 2 kb en amont du gène d'ADNr, mais dans le sens inverse. Il est nécessaire à l'activité du complexe NoRC, en effet sa déplétion entraîne la délocalisation de NoRC du nucléole (Mayer et al., 2006). Le pRNA étant complémentaire du gène, il permet le recrutement du complexe NoRC au niveau du promoteur.

3.2. Le contrôle de la transcription par modifications post-traductionnelles

Comme nous l'avons introduit plus haut, de multiples voies de signalisation convergent vers le nucléole. Ainsi, dans des conditions de carences nutritionnelles, stress oxydatif ou d'inhibition de la synthèse protéique, la transcription des ADNr va diminuer. Au contraire, les facteurs de croissance ou toute molécule qui stimule la croissance et la

prolifération vont augmenter la synthèse d'ARNr. Pour répondre rapidement à ces changements environnementaux et diminuer la très énergivore biogenèse des ribosomes, la stratégie choisie par la cellule consiste à moduler le taux de transcription des ADNr.

Pour ce faire, le procédé le plus simple et rapide est de réguler la formation du complexe de transcription ou jouant sur l'accessibilité du promoteur ou sur les composants du complexe. Il est avéré que la plupart des composants du complexe de transcription sont de potentielles cibles pour les voies de régulation.

L'exemple le plus parlant est celui de la régulation de la synthèse des ARNr durant le cycle cellulaire. En effet, le nucléole se déstructure durant la division cellulaire, ce qui entrave le processus de biogenèse des ribosomes. Il faut donc diminuer la transcription durant la mitose. Pour cela, la phosphorylation de TAF₁₁₀ appartenant au complexe SL1 par Cdk1 (Cyclin Dependent Kinase 1) de manière cycline B-dépendante entraîne la diminution de la transcription des ADNr durant la mitose (Kuhn et al., 1998). Cette phosphorylation entrave l'interaction de SL1 avec UBF et donc la formation du complexe de transcription. La déphosphorylation a lieu en fin de mitose par une phosphatase qui était séquestrée dans le nucléole durant l'interphase (Voit et al., 1999). En entrée de G1, même si SL1 est à nouveau fonctionnel, il faut encore activer UBF via diverses modifications. Elle doit être phosphorylée sur les sérine 484 et 388 par respectivement Cdk4/cyclin D1 et Cdk2/cyclin E/A. Il a été montré qu'un mutant de UBF non phosphorylable sur la sérine 388 ne peut interagir avec l'ARN pol I et ne peut donc pas activer la transcription (Voit and Grummt, 2001).

Une hypophosphorylation de UBF est caractéristique d'une cellule quiescente (O'Mahony et al., 1992). Ainsi, la phosphorylation au niveau des deux premiers HMGbox en N-terminal de UBF par ERK (Extracellular signal-Regulated Kinase) active la transcription en réponse à des facteurs de croissances. De même, la protéine mTOR (mammalian Target Of Rapamycin), régulateur de la croissance et de la prolifération cellulaires, phosphoryle le domaine C-terminal de UBF pour stimuler la transcription de l'ARN pol I (Hannan et al., 2003).

Comme nous l'avons introduit plus haut, UBF est non seulement localisée au niveau des promoteurs des gènes d'ADNr mais également tout au long de la partie exprimée. Il a été ainsi montré que la phosphorylation de UBF par ERK lui permet de favoriser le processus d'élongation de l'ARN pol I (Stefanovsky et al., 2006).

Un autre facteur de transcription lié à l'ARN pol I est la cible de plusieurs voies de signalisation : TIF-IA. Il interagit directement avec la polymérase mais aussi avec deux TAFs du complexe SL1. TIF-IA est phosphorylable sur plusieurs sites par diverses kinases afin de moduler son interaction avec l'ARN pol I ou SL1. Elle est ciblée par les kinases Cdk2 (*cycle cellulaire*), mTOR (*nutriments*), JNK (c-Jun N-terminal kinase, *stress*), ERK2 et RSK (Ribosomal S6 Kinase) (*facteurs de croissance*) ou encore AMPK (AMP-activated protein Kinase, *privation d'énergie*) (Grummt, 2010; Hoppe et al., 2009; Mayer et al., 2005; Zhao et al., 2003).

Les protéines suppresseurs de tumeurs ou oncogènes ont également un impact sur la biogenèse des ribosomes. En effet, il faut une quantité de ribosomes suffisante afin de supporter la prolifération active des cellules tumorales. Ainsi, les suppresseurs de tumeurs ARF, pRb, p53, GSK3 β ou PTEN diminuent la synthèse d'ADNr en entravant la formation du complexe de transcription. Ils agissent en général sur les protéines UBF ou SL1 (Grummt, 2010; Hannan et al., 2000; Zhang et al., 2005). En ce qui concerne p53, l'exposition cellulaire au stress ou l'inhibition de la transcription des ADNr entraînent une augmentation du niveau de p53 qui déclenche alors l'arrêt du cycle cellulaire ou l'apoptose. P53 entrave également l'interaction entre UBF et SL1 (Rubbi and Milner, 2003).

Au contraire, les oncogènes Myc et NPM (NucleoPhosMin ou B23) activent la transcription en stabilisant la formation du complexe de transcription (**Figure 20**). cMyc est par exemple localisée dans le nucléole au niveau des sites de synthèse de l'ADNr où elle interagit avec divers éléments du complexe de transcription mais aussi avec des séquences consensus de l'ADNr (Arabi et al., 2005).

La cellule est donc capable de moduler à chaque instant la biogenèse des ribosomes en régulant la transcription des gènes d'ADNr. Il est également possible pour elle de jouer sur la maturation des ARNr puis leur assemblage avec les protéines ribosomales.

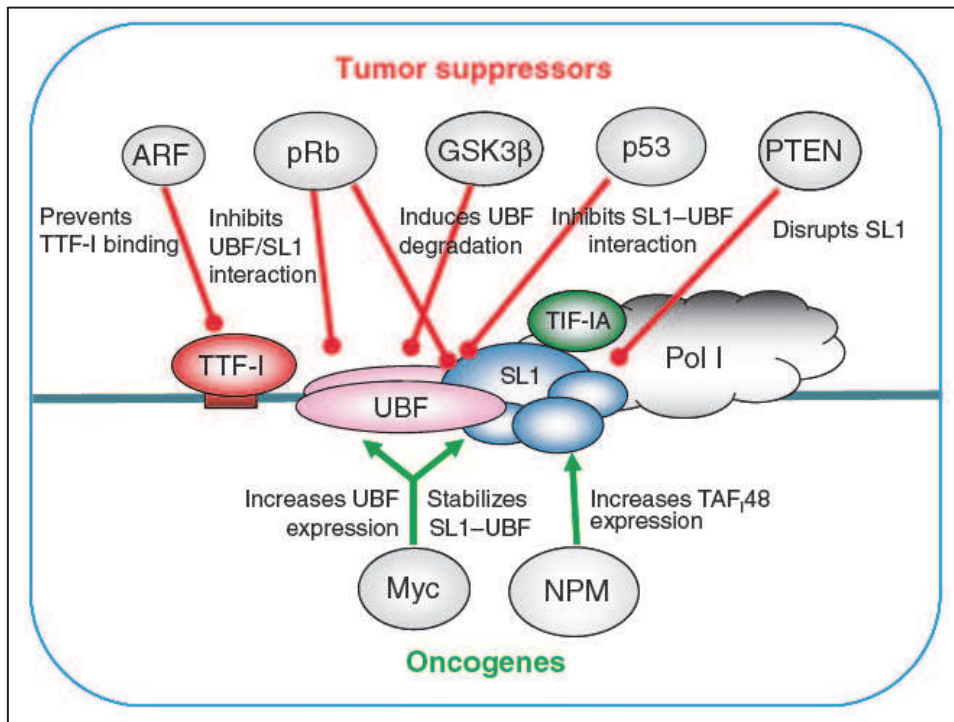


Figure 20 : suppresseurs de tumeurs et oncogènes contrôlent la transcription des ADNr
Schéma montrant les cibles des différents suppresseurs de tumeurs ou oncogènes au niveau du complexe de transcription des ADNr. D'après (Grummt, 2010)

4. La maturation du pré-ARNr.

Le processus de maturation est très complexe comme nous pouvons le voir en **figure 21** (Mullineux and Lafontaine, 2012). Les détails de ce processus ne seront pas donnés mais quelques exemples de régulations seront cités. Il faut juste signaler que le pré-ARNr 47s est très rapidement mûré afin de donner lieu au pré-ARNr 45s, et ce en clivant les séquences 5'ETS et 3'ETS. Il est possible de quantifier la transcription des ADNr par RT-qPCR en utilisant des oligonucléotides hybridant le 5'ETS.

Plusieurs activités sont mises en jeu dans ce processus complexe. Premièrement, des hélicases à ARN comme DDX21 (ou nucleolar RNA helicase 2) permettent d'ouvrir des régions double-brin d'ARN. Chez les mammifères, il a été montré que l'absence de DDX21 compromet la formation des ARNr 18s et 28s (Henning et al., 2003). Deuxièmement, des protéines modificatrices de l'ARN entrent en action en compagnie des snoARN (Small

Nucleolar ARN). Il existe des centaines de snoARN qui guident l'excision et la modification des ARNr en s'hybridant brièvement à la séquence cible afin de former des complexes ribonucléoprotéiques (Watkins and Bohnsack, 2012). La fibrillarine fait par exemple partie de ces complexes et elle contient une activité ARNr 2'-O'-méthyltransférase.

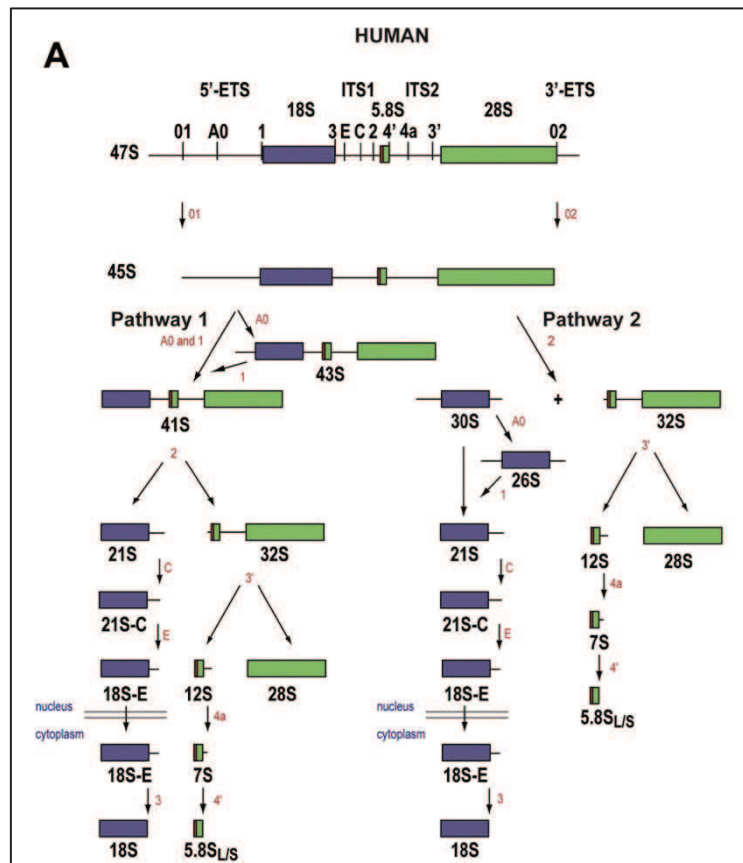


Figure 21 : le processus de maturation du pré-ARNr chez l'homme
D'après (Mullineux and Lafontaine, 2012).

Enfin, il existe également un processus de contrôle qualité des ARNr formés où les protéines B23 (nucléophosmine) et APE1 (impliquée également dans le BER) interviennent pour contrôler si les ARNr ne sont pas modifiés par des dommages oxydatifs. Ainsi, une étude montre que l'absence de APE1 induit un arrêt de la traduction et de la croissance cellulaire en présence de dommages oxydatifs de type 8-hydroxyguanine (Vascotto et al., 2009).

La voie IGF-I (Insulin-like Growth Factor-I) intervient également dans la régulation de la biogenèse des ribosomes. Premièrement, il stimule la transcription des ADNr en augmentant l'activité de UBF et la liaison au promoteur de SL1. Deuxièmement, il a été montré que cette voie régule également le processus de maturation en activant la production de la protéine WDR3 (WD Repeat containing protein 3). Cette protéine nucléaire est requise pour la maturation de l'ARN 18s, et son absence conduit à l'arrêt du cycle cellulaire via l'activation de p53 (McMahon et al., 2010).

Une autre étude a également montré que la modulation du processus de maturation des ARNr peut avoir un impact sur la fonctionnalité du ribosome. Ainsi, dans un modèle de lignée cellulaire de cancer agressif, la maturation du pré-ARNr 47 ne suit pas le cheminement habituel mais une voie particulière conduisant à la formation d'un ARNr intermédiaire 43s (Belin et al., 2009). Le profil de méthylation du pré-ARNr est également modifié ce qui conduit à l'élaboration d'un ribosome altéré. Ce dernier a perdu de sa fidélité et voit sa traduction IRES-dépendante diminuée (Internal Ribosome Entry Site). Outre les virus qui utilisent les IRES pour détourner le système de traduction de la cellule hôte, il s'avère que de nombreux ARNm de proto-oncogènes (c-myc), des facteurs de croissance, des facteurs de transcription ou des protéines du cycle ou cellulaire ou de l'apoptose possèdent aussi ce genre de structures permettant l'arrimage direct du ribosome. Pour le moment, nous ne savons pas pourquoi la perte de fidélité du ribosome est associée à l'augmentation de l'agressivité tumorale.

5. Le rôle des PARPs dans le nucléole

PARP-1 et PARP-2 sont deux membres de la famille PARP qui sont localisés dans le nucléole (Meder et al., 2005). Néanmoins, jusqu'il y a peu encore leur(s) rôle(s) dans cet organelle restai(en)t inconnu(s). En effet, à part leur interaction avec la protéine NPM (ou B23) et UBF qu'elles sont capables de poly(ADP-ribosyl)er et leur délocalisation du nucléole lorsque la transcription est inhibée, aucun lien n'a été fait entre la présence des PARPs et la biogenèse des ribosomes (pour UBF, ce sont des résultats du laboratoire non publiés) (Meder et al., 2005). Nous savons depuis peu, au moins pour PARP-1, qu'elle est impliquée dans le processus de formation/maintenance de l'hétérochromatine au niveau de l'ADNr et qu'elle module la maturation des ARNr et l'assemblage du ribosome.

5.1. L'hétérochromatinisation de l'ADNr

La première étude a permis de montrer un rôle essentiel de PARP-1 dans la formation et la maintenance de l'hétérochromatine de l'ADNr. En effet, la cellule doit pouvoir maintenir la signature épigénétique d'une région de la chromatine à chaque division cellulaire, et pour cela il faut ré-établir la signature sur le brin d'ADN naissant. Les auteurs de cette étude ont montré que PARP-1 interagit avec le pRNA et TIP5 du complexe NoRC, lui permettant alors de s'ancrer aux gènes transcriptionnellement éteints après leur réplication (Guetg et al., 2012). PARP-1 réprime la transcription des ADNr et intervient dans la mise en place de la chromatine des ADNr silencieux dans des cellules murines et humaines. Enfin, les auteurs montrent que la chromatine de l'ADNr silencieuse est une cible de l'activité enzymatique de PARP-1. En résumé, PARP-1 lie la chromatine des ADNr silencieux via le complexe NoRC dès la fin de la réplication. Elle permet alors la répression transcriptionnelle et parallèlement le ré-établissement des marques d'histones comme H3K9me2 ou H4K20me3 voire, selon les auteurs, la méthylation des CpG via la régulation de l'enzyme DNMT1 (**figure 22**).

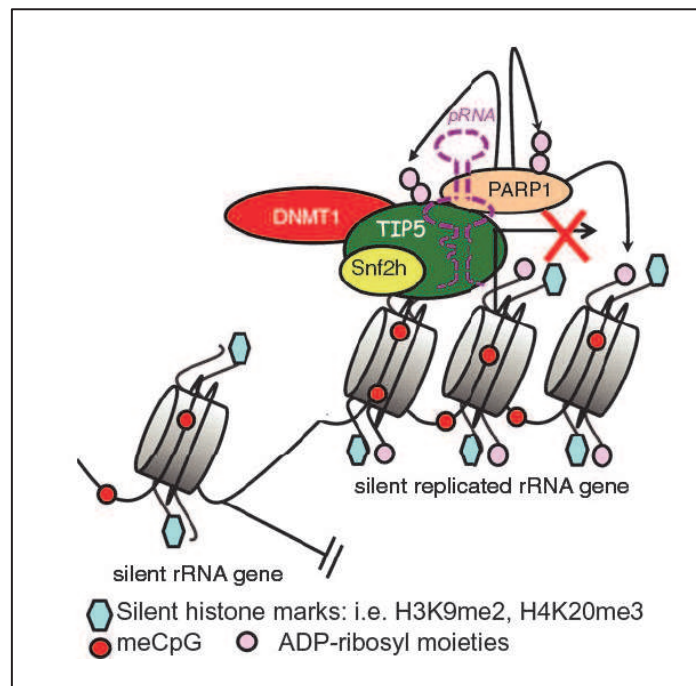


Figure 22 : PARP-1 dans le maintien de l'hétérochromatine de l'ADNr

Schéma illustrant le rôle de PARP-1 dans le ré-établissement de la chromatine silencieuse des ADNr éteints. Après la réplication des ADNr éteints, le complexe NoRC (TIP5, Snf2h) lie les CpGme. PARP-1 interagit alors avec le complexe via le pRNA et module alors grâce à son activité enzymatique le ré-établissement des marques de l'hétérochromatine. D'après (Guetg et al., 2012)

5.2. La maturation des ARNr et l'assemblage des ribosomes

Récemment, une autre étude chez la drosophile a pointé l'importance de PARP-1 dans la biogenèse des ribosomes. Plus précisément, elle semble impliquée dans la maturation des ARNr et l'assemblage des ribosomes chez la drosophile (Boamah et al., 2012; Thomas and Tulin, 2013). Les auteurs montrent que l'absence d'activité catalytique de PARP-1 entraîne une fragmentation nucléolaire et une délocalisation de protéines normalement présentes dans cet organite. C'est le cas de la fibrillarine ou de la nucléoline qui sont délocalisées dans le cytoplasme en absence de poly(ADP-ribose). Il semblerait donc que le poly(ADP-ribose) joue un rôle important dans la localisation de certaines protéines nucléolaires (**figure 23**).

Ces protéines étant impliquées dans la maturation des ARNr, il n'est pas surprenant de constater que leur absence entraîne un défaut dans la biogenèse des ribosomes. En effet, si la PARP inactive ne semble pas impacter la quantité ni la qualité finales d'ARNr matures, il est tout de même observé une augmentation du nombre d'intermédiaires dérivant du processus de maturation. Enfin, cette altération du processus de maturation a des conséquences sur l'assemblage des ribosomes. En effet, les auteurs montrent que les sous-unités 40s et 60s s'accumulent et que même la formation de polysomes – terme employé pour décrire la présence de multiples ribosomes sur un ARNm en cours de traduction – est entravée. Les cytoplasmes de cellules dépourvues d'activité catalytique de PARP-1 sont d'ailleurs deux fois plus petits que ceux de cellules contrôle. Néanmoins, aucune étude n'a permis de démontrer si ce processus est conservé chez les mammifères.

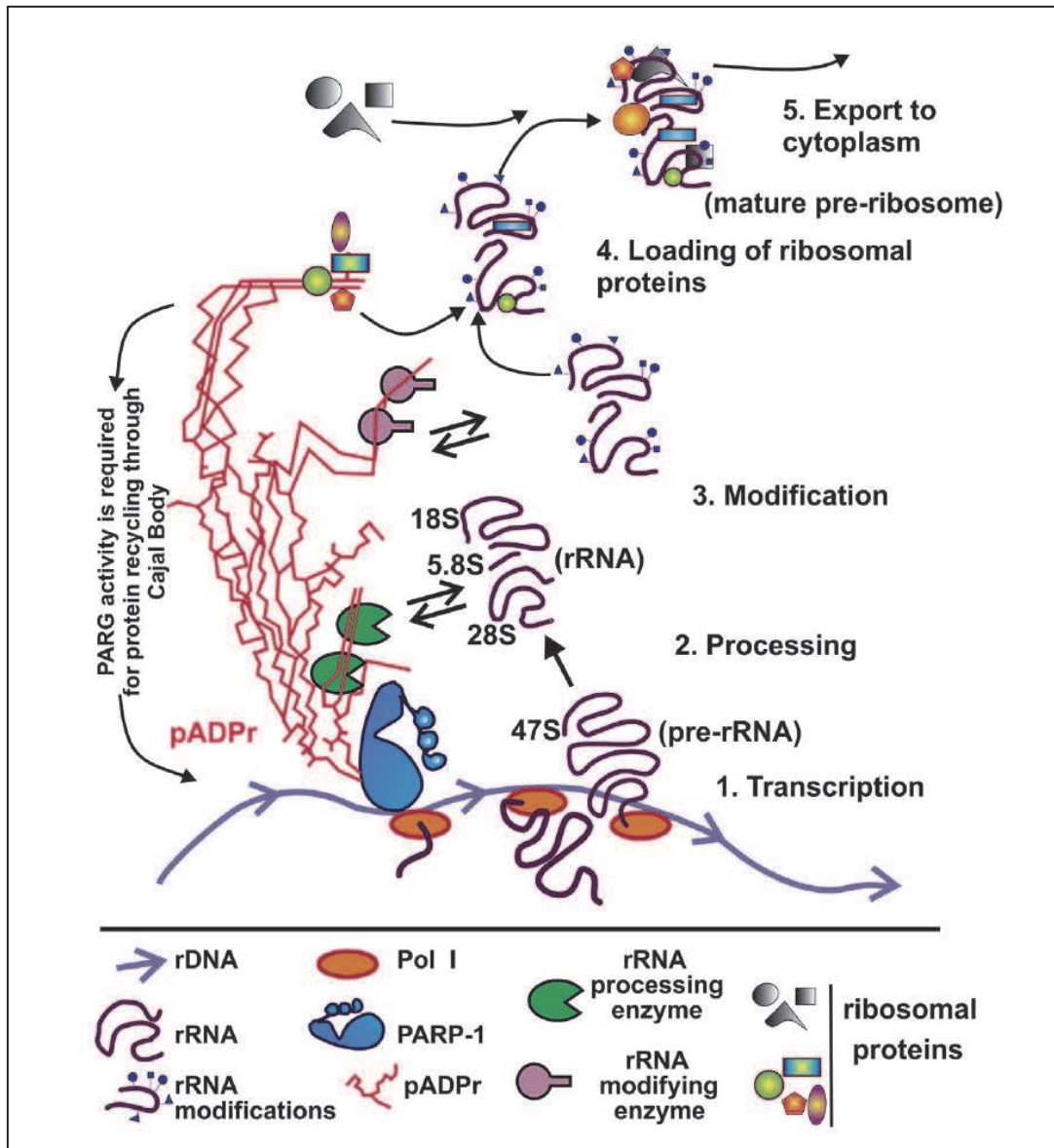


Figure 23 : PARP-1 dans la biogenèse des ribosomes

Ce schéma représente le rôle de la PARP et du poly(ADP-ribose) dans la biogenèse des ribosomes chez la drosophile. La PARP est associée à l'ADNr actif et produit du poly(ADP-ribose) dans une réaction d'automodification principalement. Le PAR permet la localisation nucléolaire de certaines protéines comme la fibrillarine ou la nucléoline qui sont impliquées dans la maturation du pré-ARNr. Il pourrait réguler également les processus de modification des ARNr ainsi que l'assemblage des protéines ribosomales avec les ARNr. D'après (Boamah et al., 2012).

VI. Objectifs du projet de recherche

Dans le but de rechercher de nouveaux partenaires de PARP-1, le laboratoire a procédé il y a quelques années à un double-hybride chez la levure à partir d'une banque d'ADNc issus de cellules humaines. Ce criblage a été à l'origine de la découverte de XRC11 et Ubc9 comme partenaires de PARP-1 (Masson et al., 1997; Masson et al., 1998). Parmi les autres candidats partenaires identifiés, nous avons porté notre attention sur la protéine HMG2L1 complètement inconnue au moment du criblage et toujours peu décrite au moment du démarrage du projet. En outre, des protéines à motif HMG ayant déjà été décrites comme des cibles pour la poly(ADP-ribosyl)ation, nous avons décidé de nous intéresser de plus près à HMG2L1 et à son association avec PARP-1 (Poirier et al., 1982).

Dans un premier temps, nous nous sommes attachés à confirmer l'interaction entre HMG2L1 et PARP-1 puis à montrer une interaction entre HMG2L1 et PARP-2. Pour cela, nous avons procédé à des immunoprécipitations de la protéine HMG2L1 en fusion avec les tags GFP et HA. Dans le but de déterminer le domaine de HMG2L1 impliqué dans l'interaction, nous avons généré des formes tronquées de HMG2L1 en fusion avec la GFP. En parallèle, nous avons également voulu savoir si PARP-1 est capable d'hétéromodifier HMG2L1 et si cette dernière peut interagir avec le PAR libre. Les résultats obtenus nous permettent de dire que HMG2L1 interagit *in vivo* et *in vitro* avec PARP-1 et PARP-2 au niveau de son domaine N-terminal. De plus, PARP-1 poly(ADP-ribosyl)e HMG2L1 sur son domaine N-terminal, ce dernier étant également impliqué dans l'interaction au PAR libre (voir chapitre I).

Dans le même temps, nous avons voulu déterminer la localisation subcellulaire de HMG2L1 dans des cellules humaines. Pour cela, nous avons utilisé les vecteurs GFP précités et constaté la localisation nucléaire et une accumulation nucléolaire de HMG2L1, comme c'est le cas pour PARP-1 et PARP-2. En parallèle, nous avons entrepris une recherche de partenaires protéiques de HMG2L1 par spectrométrie de masse. Les résultats obtenus nous ont conforté dans un potentiel rôle de HMG2L1 dans le nucléole que nous avons essayé de déterminer (voir chapitre II).

Nous avons alors entrepris la caractérisation biochimique de HMG2L1. Pour cela, nous l'avons exprimée et purifiée à partir d'*E. coli* et nous avons testé son interaction avec les acides nucléiques (ADN, ARN) par l'intermédiaire de diverses méthodes comme le retard sur gel ou l'anisotropie de fluorescence. Les résultats nous confirment l'interaction de HMG2L1 avec ces deux types de macromolécules biochimiques et nous indiquent également une potentielle activité ARN-chaperonne de la protéine. Nous montrons que les interactions entre HMG2L1 et les acides nucléiques ainsi que son activité ARN chaperonne sont régulées par la poly(ADP-ribosyl)ation. L'ensemble de nos résultats confirme une interaction fonctionnelle entre HMG2L1 et PARP-1/PARP-2 (chapitres III et IV).

HMG2L1 opère donc vraisemblablement dans le nucléole, cependant des expériences complémentaires restent nécessaires pour déterminer si cette interaction fonctionnelle intervient dans la biogenèse des ribosomes. Les premières données que nous apportons semblent aller dans ce sens (chapitre V).

RESULTATS

I. HMG2L1, un nouveau partenaire de PARP-1

1. Introduction

PARP-1 est une enzyme majoritairement impliquée dans l'expression et la surveillance de l'intégrité du génome ou encore dans diverses étapes de la vie cellulaire comme la division ou la mort. Des inhibiteurs de la PARP sont étudiés afin de tirer profit de certaines de ces fonctions – dans le traitement du cancer ou des certaines maladies inflammatoires – et en sont au stade des essais cliniques (voir Introduction, chapitre III.4). Il est donc nécessaire de connaître le mieux possible toutes les fonctions de PARP-1 afin de prévoir les conséquences souhaitables mais aussi non souhaitables de son inhibition. A titre d'exemple, si la localisation de PARP-1 et PARP-2 dans le nucléole est connue depuis plusieurs années, leur(s) rôle(s) dans cet organite était encore méconnu(s) à l'heure où nous entamions notre projet. C'est donc dans cette optique de mieux caractériser PARP-1 que le laboratoire avait procédé à une recherche de partenaires par double-hybride qui a conduit à l'identification de HMG2L1.

HMG2L1 était alors très peu caractérisée, mis à part son potentiel rôle dans la régulation de la transcription décrit dans quelques publications (Walisko et al., 2008; Yamada et al., 2003; Zhou et al., 2010). Nous avons alors décidé de nous lancer dans cette aventure qui paradoxalement était excitante, mais aussi quelque peu déroutante. En effet, nous nous lançions complètement dans l'inconnu. Afin de lancer le projet, nous avons tout d'abord à confirmer l'interaction observée en double-hybride, avant de nous intéresser au lien fonctionnel entre PARP-1 et HMG2L1. Enfin, nous voulions déterminer la localisation subcellulaire de HMG2L1 dans des cellules humaines.

Pour ces expériences, nous avons utilisé majoritairement des cellules humaines de type HEK293T pour y surexprimer nos différentes protéines dont HMG2L1-HA et GFP-HMG2L1 en vue d'immunoprécipitations, ou des cellules HeLa pour y exprimer nos protéines dans le but de procéder à une immunofluorescence. Nous avons également construit différentes formes tronquées d'HMG2L1 en fusion avec la GFP afin de cibler chaque région de la protéine. Enfin, en ce qui concerne la caractérisation biochimique du lien existant entre PARP-1 et HMG2L1, nous avons utilisé ces formes tronquées que nous avons exprimé dans

des cellules HEK puis purifié par immunoprécipitation, mais nous avons également eu recours à la protéine recombinante PARP-1 disponible au laboratoire ou à du poly(ADP-ribose) produit *in vitro*.

L'article en cours de finalisation présenté ci-après décrit la majeure partie des résultats obtenus au cours de ce travail. Des résultats complémentaires ainsi qu'une discussion de l'ensemble de ces résultats sont présentés à la suite de cet article.

Publication 2 (article en cours de finalisation)

HMG2L1, a new partner of PARP-1 with RNA chaperone activity

Thomas Kalisch, Jean-Christophe Amé, Julien Godet, Aurélia Noll, Léonie Grosdidier, Yves Mély and Valérie Schreiber.

HMG2L1, a new partner of PARP-1 with RNA chaperone activity

Thomas Kalisch¹, Jean-Christophe Amé¹, Julien Godet², Aurélia Noll¹, Léonie Grosdidier¹, Yves Mély² and Valérie Schreiber^{1‡}

¹*Biotechnology and Cell Signalling, UMR7242 CNRS, Université de Strasbourg, Laboratory of Excellence Medalis, ESBS, 300 Bd Sebastien Brant, BP 10413, 67412 Illkirch, France.*

²*Laboratory of Biophotonics and Pharmacology, UMR7213 CNRS, Université de Strasbourg, Faculty of Pharmacy, Illkirch, France*

‡Corresponding author (e-mail: valerie.schreiber@unistra.fr)

Running title: HMG2L1, PARP-1 and RNA chaperone activity

Keywords: poly(ADP-ribosyl)ation – nucleolus – RNA and DNA binding

Abstract

PARP-1 is a nuclear protein implicated in many biological processes largely related to DNA and RNA metabolism, like DNA repair and transcription. By searching for new PARP-1 partners by two-hybrid experiment in yeast, we identified the single HMGbox- containing protein HMG2L1 (High-Mobility Group 2 Like 1), a hitherto poorly described protein involved in transcription regulation. We demonstrated a direct interaction between PARP-1 and HMG2L1 and mapped the interaction domains within HMG2L1. We showed that a GFP tagged HMG2L1 accumulates within the nucleus and nucleolus of mammalian cells where it colocalizes with another HMGbox containing protein, UBF (Upstream Binding Factor). Identification of HMG2L1 partners by mass spectrometry revealed essentially RNA-binding proteins involved in ribosome biogenesis and RNA maturation. Notably, most of these partners have been described previously as PARP-1- and/or PAR-binding proteins. We showed that HMG2L1 is a target for PARylation and can bind non-covalently to PAR, but PARP activity does not regulate the interaction between HMG2L1 and its protein partners. In contrast, HMG2L1 can bind DNA in a sequence and structure-independent manner via its HMGbox domain and this interaction is inhibited by PAR. Finally, our observations demonstrate that HMG2L1 is endowed with a RNA chaperone activity that can be counteracted by PAR. Altogether, our results identified a new partner of PARP-1 likely involved in RNA metabolism or ribosome biogenesis.

Introduction

Poly(ADP-ribose) polymerases catalyse the transfer and polymerisation of ADP-ribose units from NAD⁺ to form a ramified polymer, the poly(ADP-ribose) (PAR), covalently linked to acceptor proteins or PARP themselves (Gibson and Kraus, 2012; Hakmé et al., 2008; Kraus and Hottiger, 2013). DNA strand breakage was long considered as the major trigger of this post-translational modification of proteins through the activation of PARP-1 (also named ARTD1). Actually, PARPs form a family of 17 members in human, all having in common a sequence homologous to the catalytic domain of PARP-1, but not all able of poly(ADP-ribosyl)ation (PARylation), some members displaying only mono- or no ADP-ribosyl-transferase activity (Amé et al., 2004; Hottiger et al., 2010; Kleine et al., 2008). PAR can modify the biochemical and functional properties of the target protein, either by covalent modification, or by non-covalent interaction with proteins endowed with PAR-binding capacity (Feijs et al., 2013; Kalisch et al., 2012). As such, PAR can regulate protein-protein or protein-nucleic acids (both DNA and RNA) interactions. PAR can also serve as a phishing molecule to direct the recruitment of proteins at defined sites. This is particularly well documented in the DNA damage response, where PARP-1 with its nick-sensing activity rapidly detects DNA breaks, gets activated and synthesizes PAR leading to the immediate recruitment to DNA damage site of repair factors. Finally, PAR is also receiving increasing attention as a signal molecule, defining the outcome of a cell whose DNA integrity has been injured (Wang et al., 2009; Wang et al., 2011).

PARP-1 and its closest relative PARP-2 are involved in many processes such as DNA repair, regulation of chromatin structure, transcription, recovery from replicative stress, cell differentiation, cell proliferation or cell death (see for review De Vos et al., 2012; Gibson and Kraus, 2012; Kraus and Hottiger, 2013). At a physiological point of view, PARP-1 and/or PARP-2 have been directly linked to energetic metabolism, spermatogenesis, innate and acquired immunity, hematopoiesis, biological clock or memory (Asher et al., 2010; Bai and Canto, 2012; Boehler et al., 2011; Farres et al., 2013; Luo and Kraus, 2012). At a cellular point of view, both proteins display nuclear localization and accumulation within the nucleolus (Alvarez-Gonzalez et al., 1999; Desnoyers et al., 1996; Meder et al., 2005), where PARP-1 contributes to the heterochromatinization and silencing of ribosomal RNA encoding genes (Guétg et al., 2012). At the molecular point of view, PARP-1 and PARP-2 binds to and are activated by particular DNA structures, however not necessary the same, and binding and activation is not always correlated (Clark et al., 2012; Kutuzov et al., 2013; Langelier et al., 2012).

PARP-1 is considered for long has a promising therapeutic target for cancer therapies. PARP inhibitors have entered clinical trials for treatment based on their potentializing effect on antitumor drugs targeting DNA in chemo- or radiotherapy, and on their cytotoxic effect on repair-deficient tumors (i.e. BRCA1/BRCA2). As such, it is therefore essential to pursue the in deep functional characterization of PARP-1 to better evaluate the consequences of inhibiting its activity. With this objective, we have studied the functional interaction between PARP-1 and a new putative partner identified in a yeast two-hybrid screen, HMG2L1 (High-Mobility Group protein 2 Like-1). This single HMGbox containing protein although poorly characterized has been reported to act in transcription regulation. HMG2L1 can inhibit smooth muscle differentiation by preventing transcription of specific genes (Zhou et al., 2010) and Wnt signalling by repression of β -catenin-stimulated transcription (Yamada et al., 2003). In contrast, HMG2L1 could positively regulate transcription of the 5'UTR of the Sleeping Beauty transposable element (Walisko et al., 2008), and, as a subunit of the chromatin remodeling NURF complex, of some hormone-regulated genes (Vicent et al., 2011).

In this study, we demonstrated a direct interaction between HMG2L1 and PARP-1 and mapped the interaction domains within HMG2L1. By immunofluorescence, we showed that a GFP tagged HMG2L1 accumulates within the nucleus and nucleolus of mammalian cells where it colocalizes with the HMGbox-containing protein, UBF (Upstream Binding Factor). We search for HMG2L1 partners by mass spectrometry and identified essentially RNA-binding proteins involved in ribosome biogenesis and RNA maturation. We showed that HMG2L1 is a target for PARylation, can bind non-covalently to PAR, but PARP activity does not regulate the interaction between HMG2L1 and its protein partners. In contrast, HMG2L1 binds DNA in a sequence and structure-independent manner via its HMGbox domain and this interaction is inhibited by PAR. Finally we show that HMG2L1 is endowed with a RNA chaperone activity that can be counteracted by PAR.

Materials and Methods

Plasmids – The cDNA fragments encoding full length and truncated forms of HMG2L1 were generated by PCR using pcDNA3.1/Zeo(+)-hHMG2L1-HA plasmid as a template (Walisko et al., 2008) and subcloned into the *HindIII/KpnI* sites of pEGFP-C3 (Clontech). For some constructs, a cassette encoding the SV40 Large-T nuclear localisation signal (NLS) was included to guaranty the nuclear targeting of the recombinant protein. Sequences of oligonucleotides and plasmids are available upon request.

Cell culture and DNA transfections – HeLa and HEK393T cells were grown in DMEM supplemented with 10% FCS and 50 µg/ml gentamicin. For GFP-pull down analyses, HEK393T and HeLa cells were transfected respectively by JetPEI (Polyplus) or Lipofectamine2000 (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. For immunofluorescence, cells grown on glass coverslips were transfected with Lipofectamine2000 and the medium was replaced 24 h later for the indicated time.

GFP-pull down assays – For GFP-pull down experiments, two 100 mm-Petri dishes of HEK293T or HeLa cell were lysed 48h post-transfection in lysis buffer (50 mM Tris-HCl pH8, 120 mM NaCl, 0.1% NP-40, proteases inhibitors) and lysates were clarified by centrifugation. When indicated, cells were treated 24 hours with the PARP inhibitor KU0058948 100 nM, and the inhibitor was maintained throughout the GFP-Trap. Incubation with GFP-Trap beads (10 µL) was performed for 1h at +4°C under constant agitation on a rotating wheel. Three washes were performed with washing buffer (50mM Tris-HCl pH8, 150mM NaCl, 0.1% NP-40, proteases inhibitors). Captured proteins were eluted in Laemmli buffer, boiled for 4 min and analysed by SDS-10%PAGE and Western blot. Blots were incubated with a mouse polyclonal anti PARP-1 antibody (EGT69, 1/10000), a mouse monoclonal anti UBF antibody (Santa-Cruz F9, 1/200), a mouse monoclonal anti NPM antibody (1/2000), a rabbit polyclonal anti DDX1 antibody (ProteinTech, 1/10000), a rabbit polyclonal anti fibrillarin antibody (GeneTex, 1/1000) or a mouse monoclonal GFP antibody (Roche, 1/10000). Blots were then probed with Alexa680- or Alexa800-coupled goat anti rabbit or donkey anti mouse antibodies and the fluorescence scanned using an Odyssey (Licor).

In vitro PARylation assays – The protocol used was described in Schreiber *et al* (2002). Briefly, 300 ng of purified PARP-1 were incubated with 300 ng of histone H1 or HMG2L1 at RT for 30 min in 30 µl of 50 mM Tris-HCl pH7.5 containing 1 µCi [α -³²P]-NAD⁺ and 500 ng of DNase I activated calf thymus DNA. Reaction products were separated on SDS-10%PAGE, proteins were stained with Coomassie Blue and autoradiographed. The GFP-fused proteins were expressed in HEK293T cells and collected by GFP-pulldown as described above except that the PARP inhibitor KU0058948 at 100 nM was added 3 hours before lysis and maintained throughout the pull down and that washes were performed under stringent conditions (3 washes at 4°C with washing buffer (50 mM Tris-HCl pH8, 1M NaCl, 0.1% NP-40, proteases inhibitors). Beads were split in two, with one half supplemented with 300 ng PARP-1, and PARylation was performed as described above. The reaction products were separated on SDS-10%PAGE, transferred to nitrocellulose and exposed for autoradiography before immunodetection of the GFP fusions using anti GFP antibody.

PAR-blot – Synthesis of [α -³²P]-PAR by PARP-1, purification of free PAR and PAR blot were

performed exactly as described in Dantzer et al (2004).

Indirect immunofluorescence – Cells grown on glass coverslips were treated as described in the legends of the figures. Treatment with actinomycin D (0.05 µg/ml) or dichlororibofuranosyl benzimidazole (DRB, 100 µM) was performed 3 h before fixation. Cells were washed with PBS and fixed 15 min either with 2% Formaldehyde (FA) or 1% FA, 0.1% Triton in ice cold PBS. Cells were washed three times with ice cold PBS/0.1% Triton/0.5% BSA, then incubated overnight at 4°C with an affinity purified rabbit polyclonal anti-PARP-2 antibody (Yuc 1:200), UBF (Santa Cruz-F9, 1/100) or a anti-PARP-1 (C₂₋₁₀, 1:200) antibodies. After three washes with ice cold PBS/0.1% Triton, cells were incubated for 3 h at 4°C with an Alexa-Fluor 568 goat anti-rabbit IgG (1:2000, Molecular Probes) or an Alexa-Fluor 488 goat anti-mouse IgG (1:2000, Molecular Probes). DNA was counterstained with DAPI (25 ng/ml in PBS/0.1% Triton). Cells were observed with a Leica DMRA2 microscope equipped with an ORCA-ER chilled CCD camera (Hamamatsu) and the Openlab capture software (Improvision).

Proteomic analyses - A 150 mm-Petri dish at 70% confluency of HEK293T cells transfected 48 h before with the appropriated constructs was used for each sample. When indicated, cells were treated 1 hour with the PARP inhibitor KU0058948 120 nM, and the inhibitor was maintained throughout the GFP-Trap. Cells were lysed in Tris-HCL pH7.5 50 mM, NaCl 150 mM, 0.1% NP40, 0.1% Tritonx100, PMSF 0.5 mM, DTT 1 mM and CompleteMini protease Inhibitor Cocktail (Roche). Genomic DNA was fragmented by sonication 3x20 sec and nucleic acids were removed by incubation with DNase I 200µg and RNase A 200µg for 90 min at +4°C. Incubation with GFP-Trap beads (Chromotek, Munich) was performed for 2 hours at +4°C under constant agitation on a rotating wheel. Two washes were performed with 150 mM NaCl, two more by increasing NaCl concentration to 200 mM NaCl. Captured proteins were eluted twice with glycine 0.1M pH 2.6 and mixed with one volume of NaCl 200 mM, and 60% of the total eluate was precipitated with 10% TCA for 15min at 4°C and centrifuged for 30 min at 4°C. The pellet was washed with cold acetone, air dried, and samples were analyzed by micro-capillary LC/MS/MS at The Taplin Biological Mass Spectrometry Facility (Harvard Medical School, MA) or by Multidimensional Protein Identification technology (MudPit) at the Proteomic Facility at IGBMC (Illkirch, France). Ten % of the eluate were analysed by SDS-15%PAGE followed by Coomassie staining. Data were sorted by the total number of peptides (PSM), the number of different peptides per protein (#) and the percentage of coverage. The data were filtered according to the following. Only proteins that fit with the following criteria were considered as confidently identified and thus as putative partners or HMG2L1: at least 5 times more peptides in total (PSM) or

different peptides (#) isolated with GFP- HMG2L1₁₋₄₈₅ than with GFP; at least 3 different peptides (#), or 2 peptides if coverage is higher than 10%.

DNA binding assays – For southwestern blots, proteins (2 µg of HMG2L1 full-length, 1 µg of BSA and PARP-1.40kDa and 500 ng of hPARP-1 and mPARP-2) were separated on SDS-10%PAGE, transferred to nitrocellulose and renatured overnight in renaturation buffer (TBT-tween 0.1%, 10 mM DTT). Membranes were incubated 1 hour in renaturation buffer in the presence of 50 pmol of the indicated Alexa680-labelled DNA probes. The sequence of each DNA probe is described in Kutuzov et al, (2013). For fluorescence anisotropy, Flap5'Alexa680 probe (25 nM) was incubated in incubation buffer (20 mM HEPES pH 7.9, 100 mM KCl, 1mM DTT, 0.5 mg/mL BSA) in the presence or absence of 20 nM of HMG2L1. Total and polarized fluorescence were recorded with a EnVision plate reader (Perkin Elmer). For the mapping of HMG2L1 domain interacting with DNA, GFP-tagged HMG2L1 constructs were isolated from HEK293T cells by GFP-Trap as described above for PAR binding, then incubated with Flap5'Alexa680 probe (100 pmol) for 30 minutes at +4°C in incubation buffer (50 mM Tris-HCl pH8, 150 mM NaCl, 0.1% NP-40). After 3 washes with incubation buffer, beads were transferred in 96 wells and fluorescence emitted by GFP and Alexa680 were measured by respectively Typhoon (GE Healthcare) and Odyssey. For electrophoretic mobility shift assays (EMSA), various concentration of HMG2L1 were incubated with Flap5'Alexa680 probe (100 fmol) at RT for 15 minutes in 20 µL of incubation buffer (20 mM HEPES pH7.9, 100 mM KCl, 1 mM DTT, 0.5mg/mL BSA). The complexes were then loaded on a pre-run 1% agarose gel in TBE 0.5x buffer and the fluorescence emitted by Alexa680 was measured by Odyssey.

RNA binding assays - For northwestern blots, we processed as for the southwestern blots described above except that an Alexa680-labelled RNA probe was used. The sequence of this RNA probe is: 5'-Alexa680-UGU-UCU-CCA-GGA-AGU-UCG-UUU-UCG-AAC-UUC-CGC-GAA-GCU-UCU-GCC-UUU-U-3'. For the mapping of HMG2L1 domain interacting with RNA, similar experiment was performed as described above for binding to DNA except that the Alexa680-RNA probe was used. For electrophoretic mobility shift assays (EMSA), similar experiment was performed as described above for DNA binding except that the Alexa680-RNA probe was used.

RESULTS

HMG2L1 interacts with PARP-1

A two-hybrid screening of a HeLa cDNA library was performed in yeast to identify proteins interacting with PARP-1. This screening previously led to the identification of XRCC1 (Masson et al., 1998) and UBC9 (Masson et al., 1997). Four clones showed identical sequence with two overlapping portions of HMG2L1 coding sequence. This defined HMG2L1 residues 264 to 392 as a putative interaction region with PARP-1 (Figure 1A). To confirm the physical interaction between PARP-1 and HMG2L1, we immunoprecipitated HA tagged human HMG2L1 (hHMG2L1-HA) expressed in HEK293T and checked for co-precipitation of PARP-1 (Figure 1B). PARP-1 was neither pulled down in cells transfected with empty vector (lane 7) or in cells expressing HA-tagged HSPA2 (lane 8), despite a weak interaction was reported previously between PARP-1 and HSPA2 (Quenet et al., 2009). In contrast, PARP-1 was efficiently pulled down in cells expressing HMG2L1-HA (lanes 9-12). The interaction between PARP-1 and HMG2L1 resisted to high stringent washes up to 400 mM KCl (lane 12). We next examined which domain of HMG2L1 was able to bind PARP-1. Plasmids expressing truncated version of human HMG2L1 fused to GFP (Figure 1C) were transfected in HEK293T cells and recombinant proteins were immunoprecipitated using anti-GFP coupled beads (Figure 1D). Endogenous PARP-1 was efficiently co-purified with GFP-HMG2L1 (lane 2) but not with GFP (lane 1), confirming specific interaction between HMG2L1 and PARP-1. Notably, PARP-1 was pulled down with all the truncated forms of HMG2L1 except the C-terminal hydrophobic/acidic domain only (residues 399-601, lane 7). This suggests that besides the internal region identified by yeast two-hybrid screening, the entire N-terminal domain of HMG2L1 interacts with PARP-1. To test if the binding was direct between the two proteins, we mixed purified PARP-1 with HA-HMG2L1 produced by *in vitro* translation in rabbit reticulocytes. HA-HMG2L1 was co-immunoprecipitated with anti PARP-1 antibodies only if PARP-1 was present, not BSA (Figure 1E), demonstrating a direct interaction. Taken together, these results demonstrate the direct binding of HMG2L1 to PARP-1 and identified within the N-terminal part of HMG2L1 at least two regions of interaction. Of note, PARP-2 was also able to directly interact with HMG2L1 *in vitro* (data not shown) and *in vivo* (Figure 5).

HMG2L1 is PARylated by PARP-1 and binds PAR

To test if HMG2L1 was a target for PARylation, we first produced a His-tagged human HMG2L1 in *E. Coli* and purified the recombinant protein on a HiTrap column (GE

Healthcare). HMG2L1 was never obtained as a single band, but at least as 2 to 3 major bands and many minor bands (Figure 2A, lane 3). All these bands were however degradation products, since they could be recognized by two anti HMG2L1 antibodies recognizing either the first N-terminal residues or an unknown internal region (data not shown). This high propensity to degrade could be attributed to the highly disorganized N-terminal part of HMG2L1 (see discussion). To define the quantity of 6His-HMG2L1 to be used in further experiments, we estimated the concentration of the full-length protein by comparing the intensity of the higher band with a range of BSA concentrations on Coomassie-Blue stained 10%SDS-PAGE (data not shown). We estimated a concentration of 130 ng/ μ l of full length 6his-HMG2L1 in our purified protein preparation. To evaluate the ability of PARP-1 to PARylate HMG2L1 *in vitro*, we incubated both proteins in the presence of DNase I activated calf thymus DNA and 32 P-NAD⁺ and analyzed the reaction products by SDS-10%PAGE and autoradiography. In these conditions, PARP-1 is autoPARylated (lanes 5, 6 and 8) and can PARylate the positive control histone H1 (lane 5) and the 2 major bands corresponding to HMG2L1 (lane 8). PARP-2 was also able to PARylate HMG2L1 in *in vitro* assays (data not shown). To map the region of HMG2L1 targeted for PARylation, we expressed in HEK293T cells truncated versions of HMG2L1 fused to GFP and pulled-down the recombinant proteins on GFP-Trap beads upon stringent conditions to limit copurification of endogenous proteins. Trapped proteins on the beads were incubated for 30 min with PARP-1 or no protein, in the presence of [32 P]-NAD⁺ and activated DNA, then analyzed by SDS-10%PAGE and autoradiography (Figure 2B). PARP-1 was able to efficiently PARylate all constructs containing part of the N-terminal half of HMG2L1 (lanes 4, 6, 8, 10 and 12), more weakly the HMGbox (lane 14), but not the C-ter domain (lane 16). Altogether, these results define HMG2L1 as a new target for PARylation. We next examined by PAR-blot whether HMG2L1 could bind non-covalently to PAR. Purified HMG2L1 as well as negative (BSA) and positive (H1) controls were spotted on nitrocellulose and incubated with radioactive free PAR (Figure 2C). Whereas BSA did not bind [32 P]-PAR as expected, HMG2L1, like histone H1, could bind [32 P]-PAR. To map the region of HMG2L1 endowed with PAR-binding ability, we performed GFP-pull down as described above for Figure 2B. The pulled-down proteins were separated on SDS-10%PAGE, transferred to nitrocellulose and incubated with radioactive [32 P]-PAR (Figure 2D). As expected, the positive control corresponding to the BRCT1 domain of XRCC1 efficiently bound PAR (lane 8), in contrast to the negative control GFP alone (lane 1). All constructs containing part of the N-terminal half of HMG2L1 (lanes 2-6) bound PAR, whereas a construct harbouring the HMGbox and C-ter domain (lane 7) did not. These results defined HMG2L1 as a novel PAR-binding protein, interacting with PAR via its N-terminal domain.

HMG2L1 accumulates in transcriptionally active nucleolus

To determine the subcellular localisation of HMG2L1, we first attempted to detect the endogenous protein in HeLa and mouse 3T3 cells using available commercial and our home made antibodies. The signal immunodetected was never reduced in cells transfected with a siRNA targeting HMG2L1 (data not shown), questioning about the specificity or the capacity of these antibodies to detect native protein. We therefore examined the subcellular localization of HMG2L1 fused to GFP in living or fixed cells. GFP-HMG2L1 was found exclusively in the nucleus of transfected HeLa cells, with a strong accumulation in the nucleoli and into large nuclear foci (Figure 3A, left panel). In highly expressing cells, the nucleolar staining was almost not visible due to elevated number of these nucleolar foci (Figure 3A, right panel). These foci are not identified yet but since their amount and size apparently increased with the level of expression, we subsequently focused our attention on low expressing cells only. This subcellular distribution was identically observed in mouse 3T3 cells, and was not different in living cells or after cell fixation with formaldehyde (data not shown). Moreover, the presence of GFP at the N-terminus of HMG2L1 did not alter the subcellular localization of the protein since similar distribution was observed with a C-terminally HA-tagged HMG2L1-HA fusion protein (data not shown). Since PARP-1 and PARP-2 were both described as nuclear proteins accumulating within the nucleolus (Alvarez-Gonzalez et al., 1999; Desnoyers et al., 1996; Meder et al., 2005), we stained GFP-HMG2L1 expressing cells with anti-PARP-1 or anti-PARP2 antibodies. Both PARPs showed strong but homogenous nucleolar accumulation as described previously (Alvarez-Gonzalez et al., 1999; Desnoyers et al., 1996; Meder et al., 2005), whereas GFP-HMG2L1 accumulated at defined punctate regions within the nucleolus, resembling the fibrillar centers (Figure 3B). Indeed, a clear colocalisation of GFP-HMG2L1 with the RNA polymerase I transcription factor Upstream Binding Factor UBF confirmed the preferential accumulation of GFP-HMG2L1 within the fibrillar centers (Figure 3C). Cell treatment with actinomycin D at 50 ng/ml for 3 hours, conditions known to inhibit ribosomal RNA transcription by RNA polymerase I, triggered the segregation of GFP-HMG2L1 and UBF to nucleolar caps (Figure 3D), indicating that the nucleolar accumulation of GFP-HMG2L1 depends on active nucleolar transcription. Similar co-segregation of GFP-HMG2L1 and UBF was observed after cell treatment for 3 hours with 100 μ M dichlororibofuranosyl benzimidazole (DRB, Figure 3D), a compound that unravels and disperses the nucleolar transcription units (Panse et al., 1999). Taken together, these results indicate that HMG2L1 accumulation within nucleoli is dependent on active nucleolar transcription.

Next, to gain insight into the determinants required for the nucleolar accumulation of HMG2L1, we cloned partial cDNA fragments in-frame with the C-terminus of GFP (Figure 4A) and followed the distribution of the recombinant proteins in living HeLa cells (Figure 4B and data not shown). Removal of the C-terminal region alone (GFP-HMG2L1₁₋₄₈₅) or with the HMG box domain (GFP-HMG2L1₁₋₄₀₆) did not modify the subcellular distribution of the protein, still accumulating in nucleoli and nuclear foci. A shorter N-terminal construct, GFP-HMG2L1₁₋₂₀₆, was no longer observed in nuclear foci but was still present within the nucleolus. A weaker nucleolar accumulation was noticeable for the region spanning the PARP-1-interacting region identified in the two-hybrid screen (GFP-HMG2L1₂₇₁₋₄₀₆). Whereas isolated HMGbox displayed a weak nucleolar accumulation (GFP-HMG2L1₃₉₉₋₆₀₁), the presence of the C-terminal part prevented this nucleolar accumulation. This isolated C-terminal domain was itself excluded from the nucleolus, even when forced to enter the nucleus when fused to the NLS of the SV40-Large T antigen (Figure 4B).

HMG2L1 interacts with proteins involved in ribosome biogenesis and RNA metabolism

In order to gain insight into the functional role of HMG2L1, we performed proteomic analysis to establish the HMG2L1 interactome. HEK293T cells expressing GFP-HMG2L1, GFP-HMG2L1₁₋₄₈₅ or GFP alone were lysed and GFP-tagged proteins were immunoprecipitated using GFP-Trap beads. We mainly used the construct lacking the Cter domain, since its elution from the beads after immunoprecipitation was more efficient than the full-length protein. Copurifying proteins of three independent experiments were analysed by mass spectrometry, by either Multidimensional Protein Identification (MudPit) or micro-capillary LC/MS/MS. In two experiments, additional samples were analysed, obtained by pretreating the GFP-HMG2L1₁₋₄₈₅ cells with the PARP inhibitor KU0058948 at 120 nM for 1 hours. Results displayed in Figure 5 and Supplementary Table 1 revealed that proteins copurifying with HMG2L1 were mainly ribosomal subunits and proteins involved in ribosome biogenesis or RNA maturation, mainly of which are found within the nucleolus. Proteins from both 60S and 40S ribosome subunits were identified (Figure 5B). The RNA-binding proteins pulled-down with HMG2L1 are involved in either mRNA splicing or rRNA maturation. Of note, the majority of HMG2L1 interacting proteins, including ribosomal proteins, have been reported previously to interact with PARP-1, PARP-2, PARG or PAR in proteomic analyses (Figure 5B and Supplementary Table 1) (Gagné et al., 2003; Gagné et al., 2008; Isabelle et al., 2010). Generally, inhibition of PARP activity by KU0058948 did not significantly affected the interaction between HMG2L1 and its partner (Supplementary Table 1), suggesting that PARP activity does not regulate HMG2L1 functions through protein/protein interactions. To verify this, we performed GFP-Trap experiments with GFP-HMG2L1 and GFP in HeLa cells

treated or not with the PARP inhibitor KU0058948. The very efficient PARP inhibition, controlled with an anti-PAR antibody, neither affected PARP-1, PARP-2, nucleophosmin (NPM), DDX21 nor fibrillarin (FBL) interaction with HMG2L1 (Figure 5C), showing that HMG2L1 interaction with these partners is independent on PARP activity.

The interaction of HMG2L1 with DNA is regulated by PAR

The DNA binding capacity of HMG2L1 was first examined by southwestern blot (Figure 6A), in which purified HMG2L1 (even lanes) and a mixture of positive (PARP-1, PARP-2) and negative (BSA, PARP-1 catalytic domain) controls (odd lanes) were separated by SDS-10%PAGE, transferred onto nitrocellulose membrane, renatured and incubated with different types of fluorescently labelled-DNA probes, as indicated. All the probes tested could bind to the positive controls PARP-1 and PARP-2 and to the different fragments of HMG2L1, confirming a structure independent DNA binding. Binding to DNA was also confirmed by fluorescent anisotropy, demonstrated by the increased polarization of light upon the addition of HMG2L1 (Figure 6B). Using GFP-pull down and incubation with the Flap5' DNA probe, we showed that HMG2L1 binds DNA mainly via its HMG box, and more weakly via the first 270 N-terminal residues (Figure 6C). HMG2L1 binding to DNA was also confirmed by EMSA, with increasing HMG2L1 concentration leading to the progressive appearance of lower migrating smearing bands (Figure 6D). This smear likely reflects the fact that purified HMG2L1 contains several differently sized degradation bands in addition to the full-length protein. Of note, in the presence of PAR, the HMG2L1-DNA complexes could not efficiently form, and this inhibitory effect was proportional to the amount of PAR present in the reaction mixture (Figure 6E). Taken together, these results demonstrated that HMG2L1 binds DNA in a sequence and structure-independent manner, via mainly its HMGbox, and this DNA binding can be counteracted by PAR.

HMG2L1 is a RNA-chaperone regulated by PAR

The fact that mainly RNA binding proteins were identified in the mass spectrometry analyses of HMG2L1 partners prompted us to test whether HMG2L1 was able itself to bind RNA. A northwestern blot experiment was performed using a fluorescent RNA probe that corresponds to a portion of the Flap5' DNA probe used previously (Figure 7A). Results showed that HMG2L1 binds very efficiently to this RNA probe (lane 1), more efficiently than either PARP-1 or PARP-2 (lane 2), that were shown previously to bind RNA (Parent et al., 2005 and our previous observations). Using GFP-pull down and incubation with the fluorescent RNA probe (Figure 7B), we showed that HMG2L1 binds RNA (lane 3) mainly via

its first 406 N-terminal residues (lane 4). Binding seems however not as efficient as the one observed for the positive control MLN51 (lane 1), a RNA-binding component of the exon-junction complex (Baguet et al., 2007). HMG2L1 binding to RNA was next examined by EMSA. Increasing HMG2L1 concentration lead to the appearance of a lower migrating band (Figure 7C, lanes 2-6). Kinetics experiments showed that the proportion of the shifted band increased with time upon incubation at 4°C (Figure 7D, upper panel, odd lanes). Of note, at long incubation times, the shifted band could appear even in the absence of HMG2L1 (lanes 10 and 12). This suggests that this shifted band (named II) rather reflects an alternative structure of the RNA probe (named I) than a protein-RNA complex. Modelisation of the putative structures of this RNA probe by RNAfold software (<http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAfold.cgi>) indicated that the monomers have free energy of about -15kCal/mol, whereas a dimer can be formed with a free energy of -43.3kCal/mol (Figure 7E). This RNA probe, after converted to structure II, could not be converted back to structure I by heating at 98°C (data not shown), further supporting that structure II is very stable. It is thus very likely that these two forms observed correspond to monomer (structure I) and dimer (structure II). When performing the EMSA experiment at higher temperature (22°C), structure II formed spontaneously more efficiently than at +4°C (Figure 7D, lower panel, even lanes), further supporting the idea of formation of an energetically stable dimer. Very clearly, the presence of HMG2L1 accelerated the formation of structure II at both temperatures. This is exactly the definition of a RNA chaperone activity (Rajkowitsch et al., 2007), suggesting that HMG2L1 could be a RNA chaperone. Importantly, in the presence of PAR, the HMG2L1-mediated RNA conversion of structure I to structure II was less efficient, and this inhibitory effect was proportional to the amount of PAR present in the reaction mixture (Figure 7F). Taken together, these results demonstrated that HMG2L1 binds RNA in a structure-independent manner, via its N-terminal part, and that HMG2L1 is endowed with a RNA chaperone-like activity that can be inhibited by PAR.

DISCUSSION

In this work, we have identified HMG2L1 as a new partner and substrate for PARP-1, localised in the nucleus and nucleolus, in complexes with ribosomal proteins and proteins involved in RNA metabolism, able to bind DNA and RNA and endowed with RNA chaperone activity regulated by PARP activity.

HMG2L1 contains only one characterized functional domain, the HMG box. We demonstrate here the functionality of this domain and showed that HMG2L1 is able to recognize DNA in a sequence and structure-independent manner. The N-terminal part upstream of this HMGbox

is highly basic, rich in lysines and arginines, with an isoelectric point (PI) of 9.4 and a hydrophaticity of -1.17 (Figure 8). This region mediates not only the interaction with PARP-1, but also with PAR, DNA and RNA and is the target for PARylation, as summarized in Figure 8. This part of HMG2L1 is predicted to be highly disorganized (according to PONDR-fit prediction, Figure 8). Interestingly, disorganized regions are proposed to play key roles in RNA chaperones, either to help solubilization or to loosen the RNA structure via transient binding to facilitate structural changes (Tompa and Csermely, 2004) (see below). In contrast to the N-terminal part of HMG2L1, the C-terminal part (residues 512-601) is acidic (pI of 4.43) and hydrophobic (hydrophaticity of +0.43, Figure 8). This region is dispensable for HMG2L1 interaction with proteins, PAR, DNA and RNA, and also dispensable for the RNA chaperone activity (not shown). The role of this region needs further investigations as it is the most conserved part of HMG2L1 across species (80 % identity calculated using ClustalX), and is specific to HMG2L1 proteins since it shows no sequence homology with any other protein in databases.

Our studies showed that HMG2L1 is a nuclear protein that strongly accumulates within the nucleolus, where it perfectly colocalized with UBF. Since HMG2L1 has already been described as a co-regulatory factor in transcription regulation, we first hypothesised that its nucleolar function could deal with ribosomal RNA transcription regulation. Moreover, PARP-1 was shown to contribute to the regulation of ribosomal RNA production by promoting the silencing of ribosomal rDNA units to prevent their transcription (Guettg et al., 2012). In many cells, mostly those overexpressing high levels of GFP-HMG2L1, we observed that GFP-HMG2L1 and UBF accumulated into nucleolar caps, the formation of which is a sign of nucleolar stress and transcription inhibition (Shav-Tal et al., 2005). This suggests that overexpression of GFP-HMG2L1 could trigger nucleolar stress and thus inhibition of nucleolar transcription. Indeed, ribosomal RNA transcription measured by short BrUTP incorporation detected by immunofluorescence microscopy (Grob et al., 2009) was reduced proportionally to the level of GFP-HMG2L1 expression (data not shown). However, quantification by RT-qPCR of the transcription of the nascent pre-ribosomal RNA 47S (Grandori et al., 2005) neither decreased in a population of GFP-HMG2L1 transfected cells nor increased in HEK293T or HeLa cell depleted of HMG2L1 using siRNA (data not shown), as would be expected if HMG2L1 were a negative regulator of rRNA transcription. Therefore, our data do not support a direct role of HMG2L1 in the control of ribosomal RNA transcription. An involvement in subsequent nucleolar steps of ribosome biogenesis remains possible, owing to the numerous partners identified involved in ribosomal RNA maturation and ribosomal subunits assembly. Similar statement can be made for PARP-1. The *Drosophila* PARP-1 homologue has been reported to control precursor rRNA processing,

rRNA post-transcriptional modification and pre-ribosomal assembly (Boamah et al., 2012), but whether these functions are conserved for mammalian PARP-1 has not been examined yet.

Several RNA-binding proteins have been recently reported to be involved in the DNA damage response, being recruited to the DNA damage site in a PAR-dependent manner. This is the case for the splicing factor RBMX, the paraspeckle protein NONO or the RNA-Binding Protein Fused in Sarcoma FUS, which are recruited to laser-induced DNA damage sites. NONO and FUS have been shown to bind PAR via their RRM1 and arginine/glycine-rich (RGG) RNA-binding domains, respectively (Adamson et al., 2012; Krietsch et al., 2012; Mastrocola et al., 2013) and FUS is predicted to be a RNA chaperone. We failed to see a recruitment of GFP-HMG2L1 to laser induced DNA damages (data not shown) in conditions where GFP-XRCC1 or GFP-PARG were efficiently recruited (Mortusewicz et al., 2011). These results suggest that HMG2L1 and PARP-1 do not seem to functionally interact in the DNA damage response.

HMG2L1 binding to RNA was observed by Northwestern blot and GFP-Trap, whereas EMSA showed transition from a RNA structure to another, but no efficient binding. This is a typical characteristic of a RNA chaperone, that is no longer needed once the RNA has been correctly and stably folded (Rajkowitsch et al., 2007). This explains why RNA chaperone generally do not possess RNA binding modules displaying tight interaction interface with RNA, like RRM domain, KH domains or CCHH-zinc fingers. Instead, they display less densely packed interfaces by presenting stretches of positively charged amino acids likely positioned in defined spatial configurations, enabling a wider conformational space allowing efficient refolding reactions (Doetsch et al., 2011). Another property of RNA chaperones that applies here is that, in contrast to RNA helicases, they don't need ATP as cofactor. The RNA probe used here is rather long, thus, relatively stable monomers have to be opened prior to hybridization with a complementary monomer. Therefore, it remains to be determined at which step of this RNA conformational transition HMG2L1 is involved in: strand dissociation, strand displacement or annealing.

Proteins with RNA chaperone activity are widespread and are implicated in all essential RNA-related cellular functions, such as regulation of transcription and splicing, RNP assembly and stabilization, RNA trafficking and virus replication (Rajkowitsch et al., 2007). Our proteomic analyses suggest that HMG2L1 could be involved in all these pathways. Further work will be necessary to determine in which of these cellular functions HMG2L1 chaperone activity plays a role and whether this could be regulated by PARylation.

Acknowledgements

We acknowledge support from Centre National de la Recherche Scientifique, University of Strasbourg. T.K. was recipient of a Fondation pour la Recherche Medicale fellowship. We thank Zoltan Ivics for the HA-tagged HMG2L1 construct, Caroline Eple for her contribution in the bioinformatic analyses, Eléa Héberlé and Barbara Camuzeaux for technical help and Françoise Dantzer for helpful discussions.

References

- Adamson, B., Smogorzewska, A., Sigoillot, F. D., King, R. W. and Elledge, S. J.** (2012). A genome-wide homologous recombination screen identifies the RNA-binding protein RBMX as a component of the DNA-damage response. *Nature cell biology* **14**, 318-28.
- Alvarez-Gonzalez, R., Spring, H., Muller, M. and Burkle, A.** (1999). Selective loss of poly(ADP-ribose) and the 85-kDa fragment of poly(ADP-ribose) polymerase in nucleoli during alkylation-induced apoptosis of HeLa cells. *J Biol Chem* **274**, 32122-6.
- Amé, J. C., Spenlehauer, C. and de Murcia, G.** (2004). The PARP superfamily. *Bioessays* **26**, 882-93.
- Artimo, P., Jonnalagedda, M., Arnold, K., Baratin, D., Csardi, G., de Castro, E., Duvaud, S., Flegel, V., Fortier, A., Gasteiger, E. et al.** (2012). EXPASY: SIB bioinformatics resource portal. *Nucleic acids research* **40**, W597-603.
- Asher, G., Reinke, H., Altmeyer, M., Gutierrez-Arcelus, M., Hottiger, M. O. and Schibler, U.** (2010). Poly(ADP-ribose) polymerase 1 participates in the phase entrainment of circadian clocks to feeding. *Cell* **142**, 943-53.
- Baguet, A., Degot, S., Cougot, N., Bertrand, E., Chenard, M. P., Wendling, C., Kessler, P., Le Hir, H., Rio, M. C. and Tomasetto, C.** (2007). The exon-junction-complex-component metastatic lymph node 51 functions in stress-granule assembly. *J Cell Sci* **120**, 2774-84.
- Bai, P. and Canto, C.** (2012). The role of PARP-1 and PARP-2 enzymes in metabolic regulation and disease. *Cell Metab* **16**, 290-5.
- Boamah, E. K., Kotova, E., Garabedian, M., Jarnik, M. and Tulin, A. V.** (2012). Poly(ADP-Ribose) polymerase 1 (PARP-1) regulates ribosomal biogenesis in Drosophila nucleoli. *PLoS Genet* **8**, e1002442.
- Boehler, C., Gauthier, L., Yelamos, J., Noll, A., Schreiber, V. and Dantzer, F.** (2011). Phenotypic characterization of Parp-1 and Parp-2 deficient mice and cells. *Methods in Molecular Biology* **780**, 313-36.
- Clark, N. J., Kramer, M., Muthurajan, U. M. and Luger, K.** (2012). Alternative modes of binding of poly(ADP-ribose) polymerase 1 to free DNA and nucleosomes. *The Journal of biological chemistry* **287**, 32430-9.
- Dantzer, F., Giraud-Panis, M. J., Jaco, I., Ame, J. C., Schultz, I., Blasco, M., Koeing, C. E., Gilson, E., Menissier-de Murcia, J., de Murcia, G. et al.** (2004). Functional interaction between poly(ADP-Ribose) polymerase 2 (PARP-2) and TRF2: PARP activity negatively regulates TRF2. *Mol Cell Biol* **24**, 1595-607.
- De Vos, M., Schreiber, V. and Dantzer, F.** (2012). The diverse roles and clinical relevance of PARPs in DNA damage repair: Current state of the art. *Biochem Pharmacol* **84**, 137-46.
- Desnoyers, S., Kaufmann, S. H. and Poirier, G. G.** (1996). Alteration of the nucleolar localization of poly(ADP-ribose) polymerase upon treatment with transcription inhibitors. *Exp Cell Res* **227**, 146-53.
- Doetsch, M., Schroeder, R. and Furtig, B.** (2011). Transient RNA-protein interactions in RNA folding. *Febs J* **278**, 1634-42.
- Farres, J., Martin-Caballero, J., Martinez, C., Lozano, J. J., Llacuna, L., Ampurdanes, C., Ruiz-Herguido, C., Dantzer, F., Schreiber, V., Villunger, A. et al.** (2013). Parp-2 is required to maintain hematopoiesis following sublethal gamma-irradiation in mice. *Blood* **122**, 44-54.
- Feijs, K. L., Forst, A. H., Verheugd, P. and Luscher, B.** (2013). Macrodomein-containing proteins: regulating new intracellular functions of mono(ADP-ribosyl)ation. *Nature reviews. Molecular cell biology* **14**, 445-53.

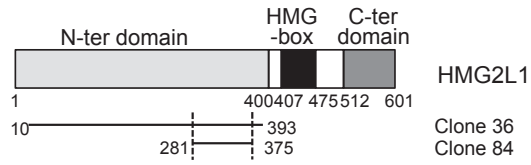
- Gagné, J. P., Hunter, J. M., Labrecque, B., Chabot, B. and Poirier, G. G.** (2003). A proteomic approach to the identification of heterogeneous nuclear ribonucleoproteins as a new family of poly(ADP-ribose)-binding proteins. *Biochem J* **371**, 331-40.
- Gagné, J. P., Isabelle, M., Lo, K. S., Bourassa, S., Hendzel, M. J., Dawson, V. L., Dawson, T. M. and Poirier, G. G.** (2008). Proteome-wide identification of poly(ADP-ribose) binding proteins and poly(ADP-ribose)-associated protein complexes. *Nucleic Acids Res* **36**, 6959-76.
- Gibson, B. A. and Kraus, W. L.** (2012). New insights into the molecular and cellular functions of poly(ADP-ribose) and PARPs. *Nature reviews. Molecular cell biology* **13**, 411-24.
- Grandori, C., Gomez-Roman, N., Felton-Edkins, Z. A., Ngouenet, C., Galloway, D. A., Eisenman, R. N. and White, R. J.** (2005). c-Myc binds to human ribosomal DNA and stimulates transcription of rRNA genes by RNA polymerase I. *Nature cell biology* **7**, 311-8.
- Grob, A., Roussel, P., Wright, J. E., McStay, B., Hernandez-Verdun, D. and Sirri, V.** (2009). Involvement of SIRT7 in resumption of rDNA transcription at the exit from mitosis. *Journal of cell science* **122**, 489-98.
- Guetg, C., Scheifele, F., Rosenthal, F., Hottiger, M. O. and Santoro, R.** (2012). Inheritance of silent rDNA chromatin is mediated by PARP1 via noncoding RNA. *Molecular cell* **45**, 790-800.
- Hakmé, A., Wong, H. K., Dantzer, F. and Schreiber, V.** (2008). The expanding field of poly(ADP-ribosylation) reactions. 'Protein Modifications: Beyond the Usual Suspects' Review Series. *EMBO Rep* **9**, 1094-100.
- Hottiger, M. O., Hassa, P. O., Luscher, B., Schuler, H. and Koch-Nolte, F.** (2010). Toward a unified nomenclature for mammalian ADP-ribosyltransferases. *Trends Biochem Sci* **35**, 208-19.
- Isabelle, M., Moreel, X., Gagne, J. P., Rouleau, M., Ethier, C., Gagne, P., Hendzel, M. J. and Poirier, G. G.** (2010). Investigation of PARP-1, PARP-2, and PARG interactomes by affinity-purification mass spectrometry. *Proteome Sci* **8**, 22.
- Kalisch, T., Ame, J. C., Dantzer, F. and Schreiber, V.** (2012). New readers and interpretations of poly(ADP-ribosylation). *Trends Biochem Sci* **37**, 381-90.
- Kleine, H., Poreba, E., Lesniewicz, K., Hassa, P. O., Hottiger, M. O., Litchfield, D. W., Shilton, B. H. and Luscher, B.** (2008). Substrate-assisted catalysis by PARP10 limits its activity to mono-ADP-ribosylation. *Mol Cell* **32**, 57-69.
- Kraus, W. L. and Hottiger, M. O.** (2013). PARP-1 and gene regulation: Progress and puzzles. *Molecular aspects of medicine*.
- Krietsch, J., Caron, M. C., Gagne, J. P., Ethier, C., Vignard, J., Vincent, M., Rouleau, M., Hendzel, M. J., Poirier, G. G. and Masson, J. Y.** (2012). PARP activation regulates the RNA-binding protein NONO in the DNA damage response to DNA double-strand breaks. *Nucleic acids research* **40**, 10287-301.
- Kutuzov, M. M., Khodyreva, S. N., Ame, J. C., Ilina, E. S., Sukhanova, M. V., Schreiber, V. and Lavrik, O. I.** (2013). Interaction of PARP-2 with DNA structures mimicking DNA repair intermediates and consequences on activity of base excision repair proteins. *Biochimie* **95**, 1208-15.
- Langelier, M. F., Planck, J. L., Roy, S. and Pascal, J. M.** (2012). Structural basis for DNA damage-dependent poly(ADP-ribosylation) by human PARP-1. *Science* **336**, 728-32.
- Luo, X. and Kraus, W. L.** (2012). On PAR with PARP: cellular stress signaling through poly(ADP-ribose) and PARP-1. *Genes Dev* **26**, 417-32.
- Masson, M., Menissier-de Murcia, J., Mattei, M. G., de Murcia, G. and Niedergang, C. P.** (1997). Poly(ADP-ribose) polymerase interacts with a novel human ubiquitin conjugating enzyme: hUbc9. *Gene* **190**, 287-96.
- Masson, M., Niedergang, C., Schreiber, V., Muller, S., Menissier-de Murcia, J. and de Murcia, G.** (1998). XRCC1 is specifically associated with poly(ADP-ribose) polymerase and negatively regulates its activity following DNA damage. *Mol Cell Biol* **18**, 3563-71.
- Mastrocola, A. S., Kim, S. H., Trinh, A. T., Rodenkirch, L. A. and Tibbetts, R. S.** (2013). The RNA Binding Protein Fused In Sarcoma (FUS) Functions Downstream of PARP in Response to DNA Damage. *The Journal of biological chemistry*.
- Meder, V. S., Boeglin, M., de Murcia, G. and Schreiber, V.** (2005). PARP-1 and PARP-2 interact with nucleophosmin/B23 and accumulate in transcriptionally active nucleoli. *J Cell Sci* **118**, 211-222.
- Mortusewicz, O., Fouquerel, E., Ame, J. C., Leonhardt, H. and Schreiber, V.** (2011). PARG is recruited to DNA damage sites through poly(ADP-ribose)- and PCNA-dependent mechanisms. *Nucleic Acids Res* **39**, 5045-56.
- Panse, S. L., Masson, C., Heliot, L., Chassery, J. M., Junera, H. R. and Hernandez-Verdun, D.** (1999). 3-D organization of ribosomal transcription units after DRB inhibition of RNA polymerase II transcription. *J Cell Sci* **112 (Pt 13)**, 2145-54.

- Parent, M., Yung, T. M., Rancourt, A., Ho, E. L., Vispe, S., Suzuki-Matsuda, F., Uehara, A., Wada, T., Handa, H. and Satoh, M. S.** (2005). Poly(ADP-ribose) polymerase-1 is a negative regulator of HIV-1 transcription through competitive binding to TAR RNA with Tat-positive transcription elongation factor b (p-TEFb) complex. *J Biol Chem* **280**, 448-57.
- Quenet, D., Mark, M., Govin, J., van Dorsselear, A., Schreiber, V., Khochbin, S. and Dantzer, F.** (2009). Parp2 is required for the differentiation of post-meiotic germ cells: identification of a spermatid-specific complex containing Parp1, Parp2, TP2 and HSPA2. *Exp Cell Res* **315**, 2824-34.
- Rajkowitsch, L., Chen, D., Stampfl, S., Semrad, K., Waldsich, C., Mayer, O., Jantsch, M. F., Konrat, R., Blasi, U. and Schroeder, R.** (2007). RNA chaperones, RNA annealers and RNA helicases. *RNA biology* **4**, 118-30.
- Schreiber, V., Ame, J. C., Dolle, P., Schultz, I., Rinaldi, B., Fraulob, V., Menissier-de Murcia, J. and de Murcia, G.** (2002). Poly(ADP-ribose) polymerase-2 (PARP-2) is required for efficient base excision DNA repair in association with PARP-1 and XRCC1. *J Biol Chem* **277**, 23028-36.
- Shav-Tal, Y., Blechman, J., Darzacq, X., Montagna, C., Dye, B. T., Patton, J. G., Singer, R. H. and Zipori, D.** (2005). Dynamic sorting of nuclear components into distinct nucleolar caps during transcriptional inhibition. *Molecular biology of the cell* **16**, 2395-413.
- Tompa, P. and Csermely, P.** (2004). The role of structural disorder in the function of RNA and protein chaperones. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **18**, 1169-75.
- Vicent, G. P., Nacht, A. S., Font-Mateu, J., Castellano, G., Gaveglia, L., Ballare, C. and Beato, M.** (2011). Four enzymes cooperate to displace histone H1 during the first minute of hormonal gene activation. *Genes Dev* **25**, 845-62.
- Walisko, O., Schorn, A., Rolfs, F., Devaraj, A., Miskey, C., Izsvak, Z. and Ivics, Z.** (2008). Transcriptional activities of the Sleeping Beauty transposon and shielding its genetic cargo with insulators. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* **16**, 359-69.
- Wang, Y., Dawson, V. L. and Dawson, T. M.** (2009). Poly(ADP-ribose) signals to mitochondrial AIF: a key event in parthanatos. *Exp Neurol* **218**, 193-202.
- Wang, Y., Kim, N. S., Haince, J. F., Kang, H. C., David, K. K., Andrabi, S. A., Poirier, G. G., Dawson, V. L. and Dawson, T. M.** (2011). Poly(ADP-ribose) (PAR) binding to apoptosis-inducing factor is critical for PAR polymerase-1-dependent cell death (parthanatos). *Sci Signal* **4**, ra20.
- Yamada, M., Ohkawara, B., Ichimura, N., Hyodo-Miura, J., Urushiyama, S., Shirakabe, K. and Shibuya, H.** (2003). Negative regulation of Wnt signalling by HMG2L1, a novel NLK-binding protein. *Genes Cells* **8**, 677-84.
- Zhou, J., Hu, G. and Wang, X.** (2010). Repression of smooth muscle differentiation by a novel high mobility group box-containing protein, HMG2L1. *J Biol Chem* **285**, 23177-85.

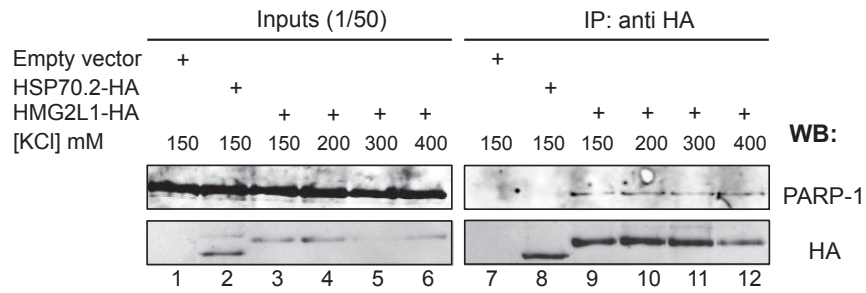
Figure 1: HMG2L1 interacts with PARP-1 *in vivo* and *in vitro*.

A. Schematic representation of HMG2L1. The regions spanned by the two clones (36 and 84) isolated in the yeast two hybrid screening as interacting with PARP-1 are represented. B. Interaction between HMG2L1 and PARP-1 resists to high stringency conditions. Lysates from HEK293T cells expressing HMG2L1-HA (lanes 3-6 and 9-12), HA-HSP70.2 (lanes 2 and 8) or not transfected (lanes 1 and 7) were subjected to immunoprecipitation with anti-HA antibody and washes performed with increasing stringency conditions as indicated (right panel), followed by western blot using successively anti-PARP-1 (top) and anti-HA (bottom) antibodies. Left panel: inputs correspond to 1/50 of the cell lysates used for immunoprecipitation. C. Schematic representation of HA- and GFP-tagged HMG2L1 constructs. D. Interaction between GFP-HMG2L1 full length or deletion constructs and endogenous PARP-1 in HEK293T cells analysed by GFP-Trap assay. The indicated GFP-tagged HMG2L1 constructs (lanes 2-7) or GFP alone (lane 1) were overexpressed in HEK293T cells, recovered by GFP-Trap and co-purifying PARP-1 was assessed by Western Blot with an anti-PARP-1 antibody (upper panels). The presence of GFP-tagged protein was revealed with an anti-GFP antibody (lower panels). Lane 8: input corresponds to 1/50 of the GFP-HMG2L1 lysate used for GFP-Trap. E. HMG2L1 and PARP-1 directly interact *in vitro*. *In vitro* translated HMG2L1-HA incubated with BSA (lanes 1 and 3) or purified PARP-1 (lanes 2 and 4) was subjected to immunoprecipitation with anti-PARP-1 antibody. Co-precipitation of HMG2L1-HA is assessed by Western Blot using anti-HA antibody. Immunoprecipitated PARP-1 is detected using anti-PARP-1 antibody.

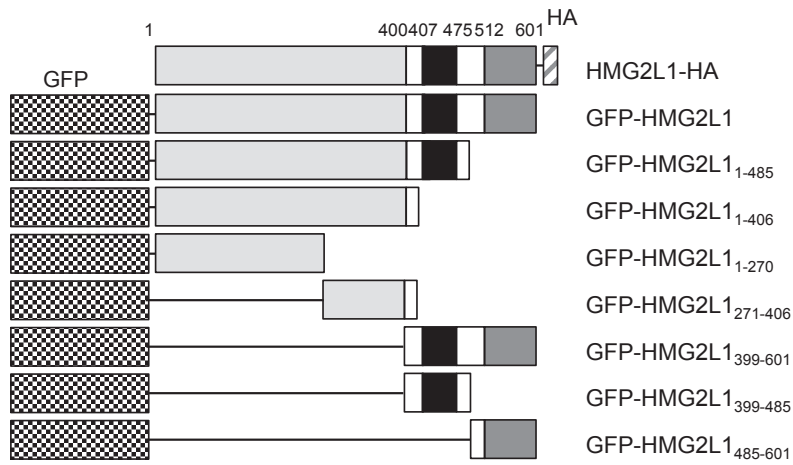
A



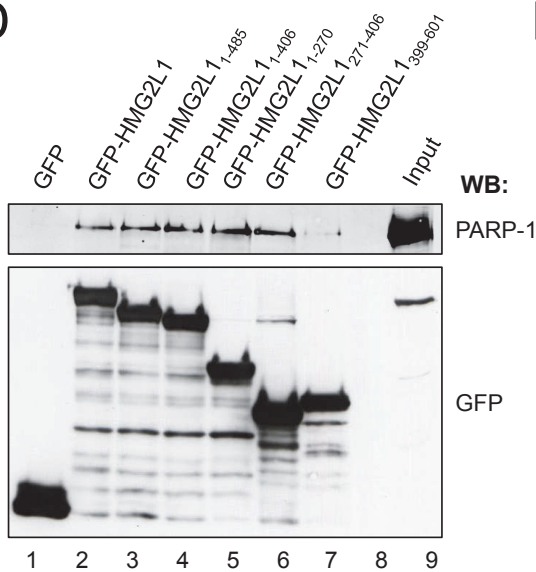
B



C



D



E

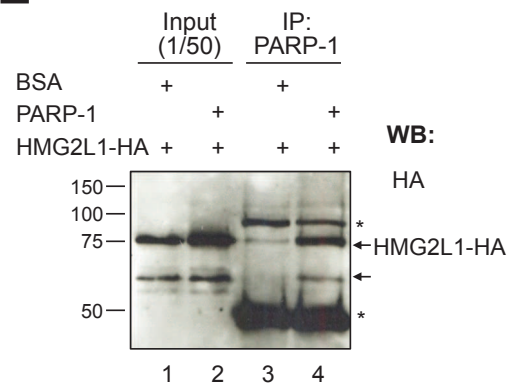
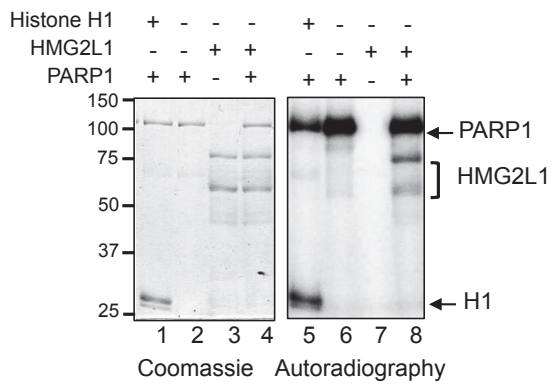


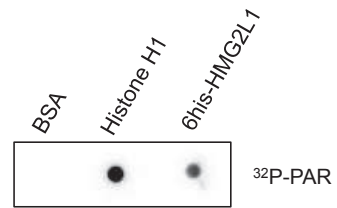
Figure 2: HMG2L1 is PARylated by PARP-1 and binds PAR.

A. HMG2L1 is PARylated by PARP-1. 6His-HMG2L1 (300 ng) was incubated with 0 (lanes 3 and 7) or 300 ng of PARP-1 (lanes 4 and 8) for 30 min at 25 °C in the presence of $^{32}\text{P-NAD}^+$ and DNase I activated DNA. As controls, PARP-1 was incubated alone (lanes 2 and 6) or with 300 ng of histone H1 (lanes 1 and 5). Reaction products were analyzed by SDS-10%PAGE and autoradiography (right panel) of the Coomassie Blue- stained and dried gel (left panel). B. Mapping of HMG2L1 regions PARylated by PARP-1. GFP-tagged deletion mutants of HMG2L1 were expressed in HEK293T cells, immunopurified on GFP-Trap beads and incubated in the activity buffer containing $^{32}\text{P-NAD}^+$ and DNase I activated in the absence or presence of PARP-1 as indicated. Reaction products were analyzed by 8% gel electrophoresis, transfer to nitrocellulose membrane and autoradiography (upper panels) and immunodetection of the fusion proteins using anti-GFP antibody (lower panels). The asterisk indicates the position of automodified PARP-1. C. Recombinant purified BSA (negative control), histone H1 (positive control) and 6His-HMG2L1 (1 μg each) were spotted on nitrocellulose membrane and incubated with ^{32}P -labelled PAR. After extensive washes, membranes were autoradiographed. D. Mapping of HMG2L1 regions that bind PAR. GFP-tagged deletion mutants of HMG2L1 (lanes 1-7) and GFP-tagged XRCC1 BRCT1 domain (lane 8) were expressed in HEK293T cells, immunopurified on GFP-Trap beads, separated on SDS-10% PAGE, blotted onto nitrocellulose membrane, renatured, and incubated with ^{32}P -labelled PAR. Upper panels: autoradiography, lower panels: Western Blot with anti-GFP antibody.

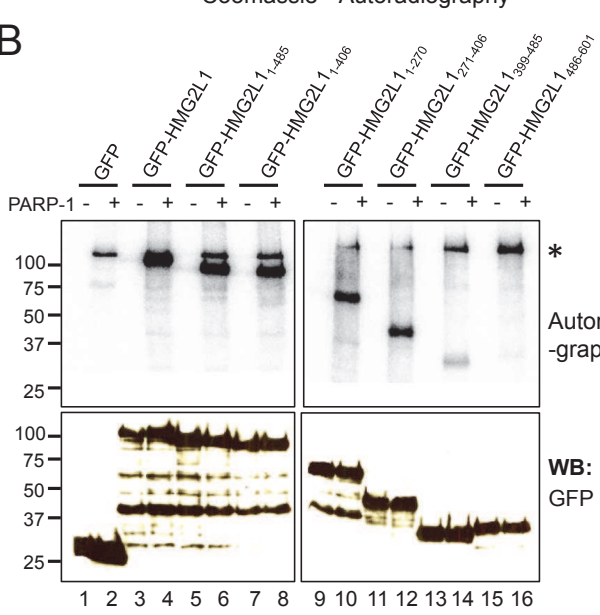
A



C



B



D

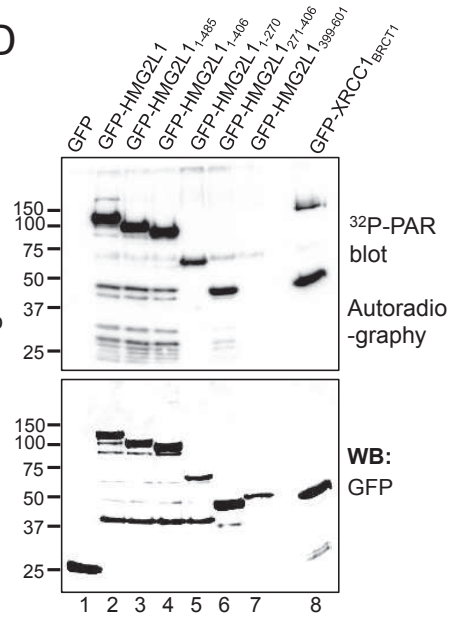


Figure 3: HMG2L1 accumulates within the nucleolus

A. Localisation of GFP-HMG2L1 in five transfected HeLa cells fixed with 4% formaldehyde, 1% Triton X-100, illustrating the nucleolar accumulation and the presence in nuclear dots that varies between cells. Nuclei are counterstained with Dapi. Bar: 10 μ m. B. The nucleolar localization of GFP-HMG2L1 partially overlap with that of immunostained endogenous PARP-1 (upper panels) and PARP-2 (lower panels) in HeLa cells fixed with 4% formaldehyde, 1% Triton X-100. Nuclei are counterstained with Dapi. Merged images of GFP-HMG2L1 and immunostained PARP-1 or PARP-2 are shown. Bar: 10 μ m. C: YFP-HMG2L1 and endogenous UBF perfectly colocalize within the nucleolus in two HeLa cells fixed as in A. Nuclei are counterstained with Dapi. Merged images of YFP-HMG2L1 and UBF are shown. Bar: 10 μ m. D. YFP-HMG2L1 is relocalized into nucleolar caps together with UBF in cells treated for 3 hours with 50 μ g/ml Actinomycin D (upper panels) or 100 μ M DRB (lower panels). Cells were fixed as in A. Merged images of YFP-HMG2L1 and UBF are shown. Bar: 10 μ m.

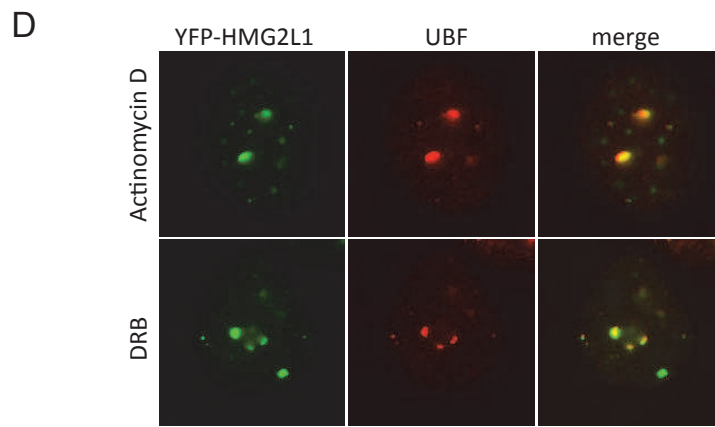
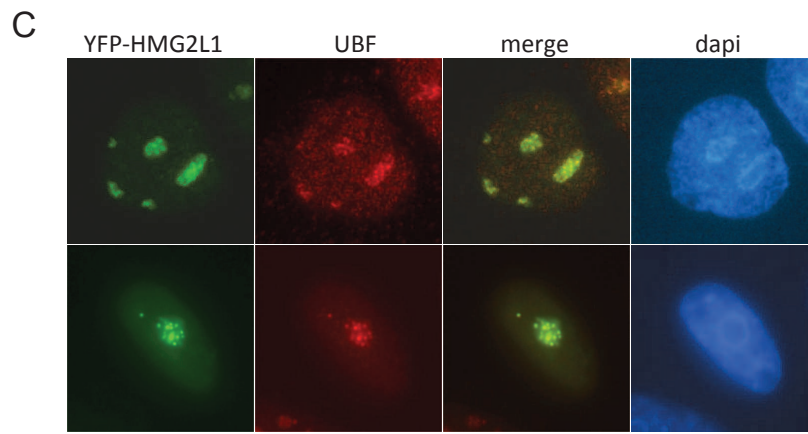
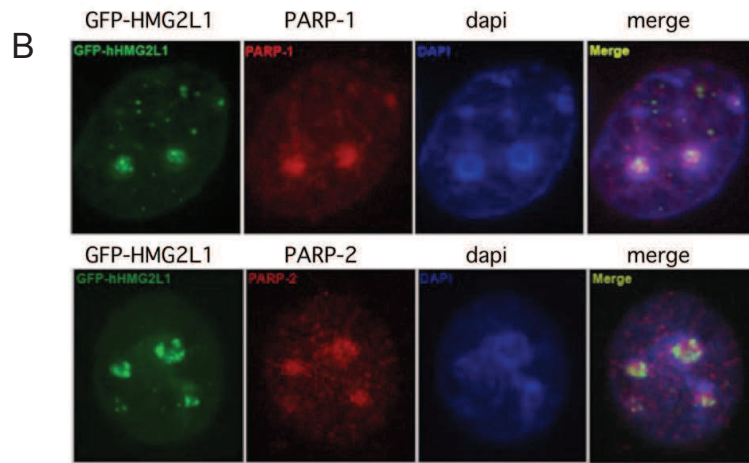
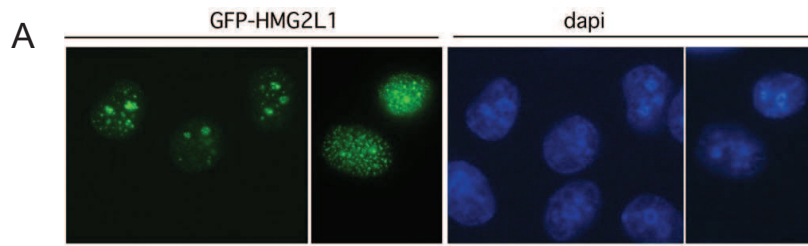
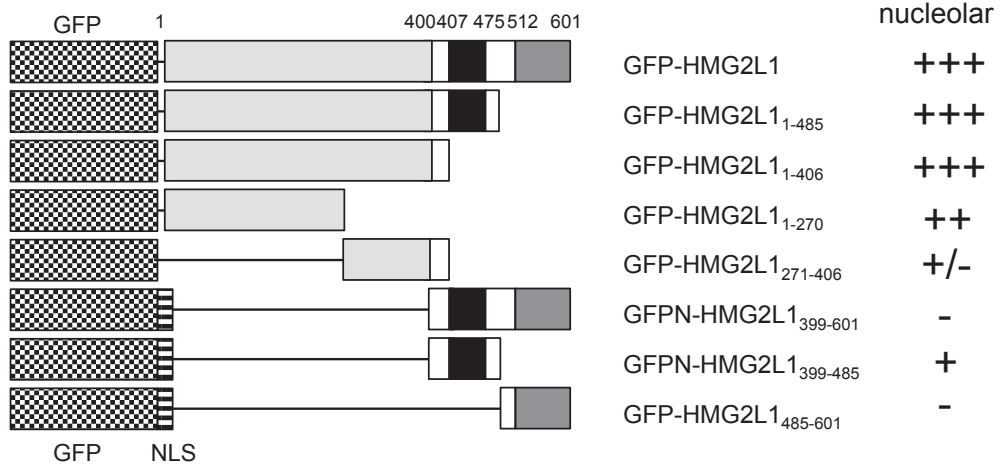


Figure 4: The basic N-terminal part of HMG2L1 mediates its nucleolar accumulation

A. Schematic representation of the GFP-tagged HMG2L1 constructs. When indicated (NLS), the NLS of SV40 Large T was inserted between GFP and HMG2L1 sequences to ensure nuclear entry of the recombinant proteins. B. Localisation of GFP-HMG2L1 truncated forms in living HeLa cells. Right panels: merge of the GFP signal with the phase contrast image. Bar: 10 μ m.

A



B

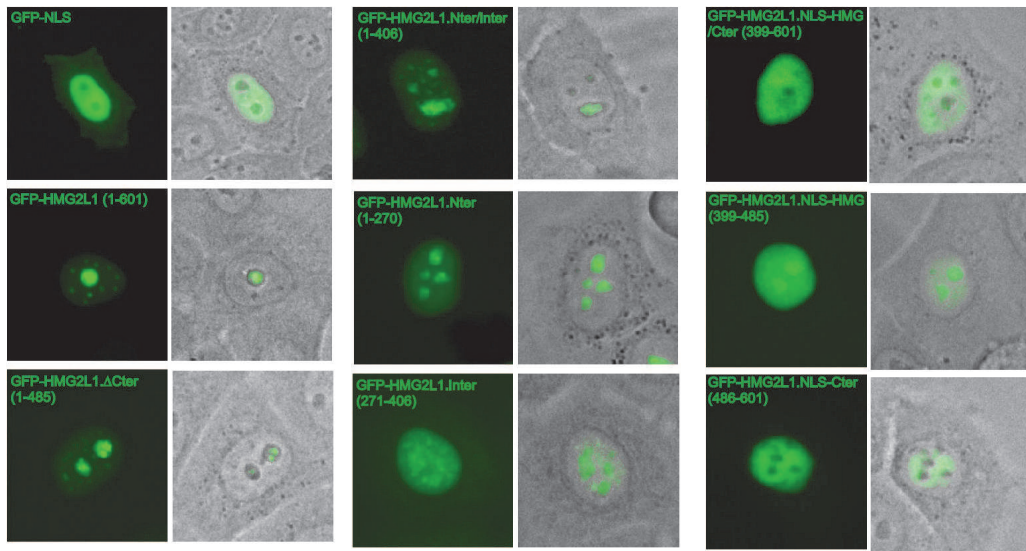


Figure 5. HMG2L1 interacts with proteins involved in ribosome biogenesis and RNA metabolism

A. Coomassie blue staining of 1/50 of the complexes isolated from HEK293T cells expressing GFP (lane 1), GFP-HMG2L1 (lane 2) and GFP-HMG2L1₁₋₄₈₅ treated (lane 4) or not (lane 3) with the PARP inhibitor KU0058849 (lane 3) and separated here on SDS-15%PAGE. The remaining complexes were analyzed by mass spectrometry. B. Proteins identified by mass spectrometry as putative partners of HMG2L1. Proteins already reported to interact with PARP-1, PARP-2, PARG or PAR (Gagné et al., 2003; Gagné et al., 2008; Isabelle et al., 2010) are italicized. C. HMG2L1 interacts with its protein partners independently of PARP activity. GFP alone (lanes 1, 2, 5, 6) and GFP-HMG2L1 (lanes 3, 4, 7, 8) were overexpressed in HEK293T cells, recovered by GFP-Trap (IP, lanes 1-4) in the presence or absence of the PARP inhibitor KU0058948 at 100 nM (lanes 2 and 4) and co-purifying PARP-1, PARP-2, NPM, DDX21 and FBL were assessed by Western Blot with the corresponding antibody. The equal amount of GFP and GFP-HMG2L1 in treated and untreated samples was confirmed with an anti-GFP antibody. Lanes 5-8: inputs corresponding to 1/50 of the lysates. PARP inhibition by KU0058948 was confirmed inputs using an anti-PAR antibody.

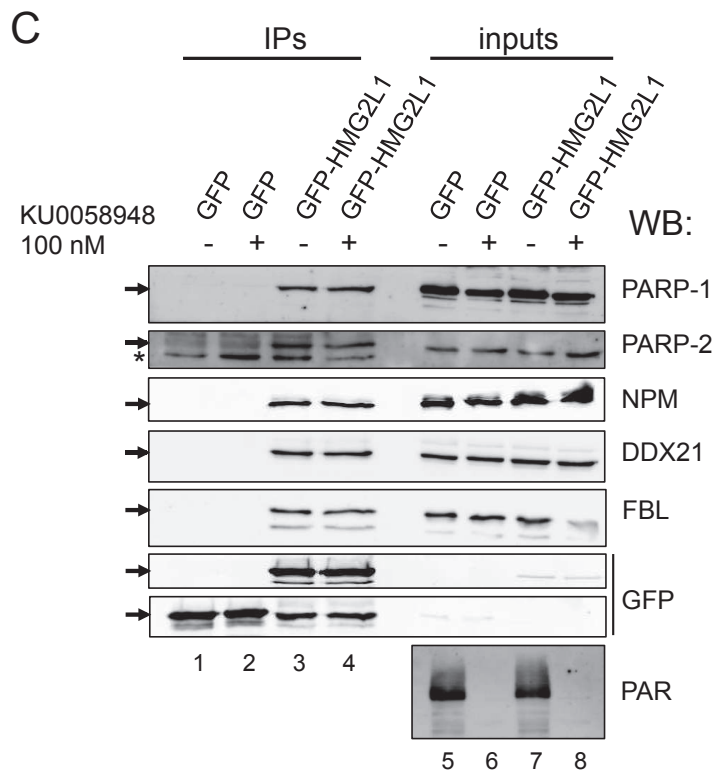
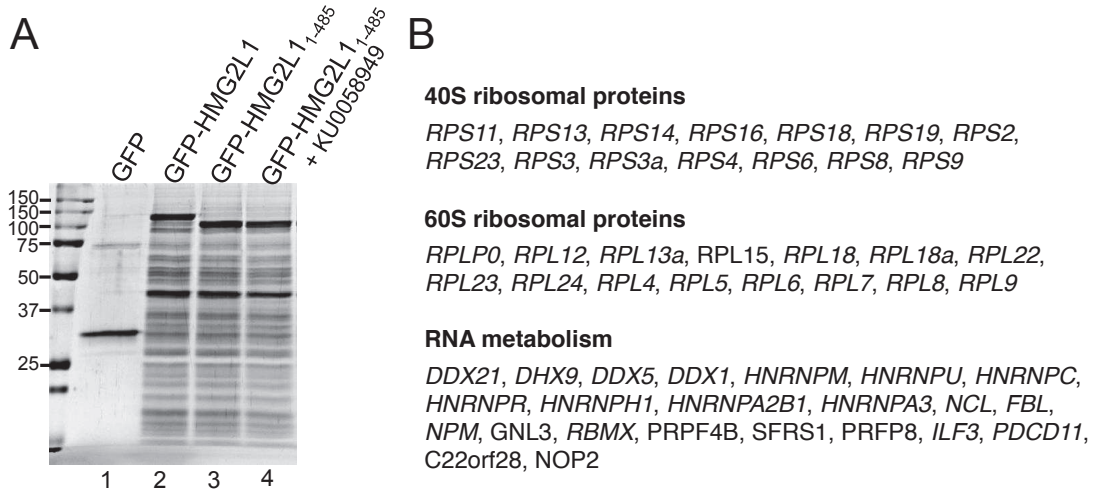


Figure 6: The interaction of HMG2L1 with DNA is regulated by PAR

A. Southwestern blot analyses revealing that HMG2L1 binds DNA in a sequence and structure-independent manner. 6His-HMG2L1 (HMG, 2 μ g, even lanes) and a mixture of positive (PARP-1, PARP-2, 500 ng) and negative (BSA, PARP-1 catalytic domain CD, 1 μ g, odd lanes) controls (C, odd lanes) were separated on SDS-10%PAGE, transferred to nitrocellulose membranes, renaturated and incubated with the Alexa680-labelled DNA structures as indicated above each condition: a 5'flap DNA (Flap5', lanes 1, 2), single strand DNA (ssDNA, lanes 3, 4), double strand DNA with 3'overhang (Over3', lanes 5, 6) and a nicked double strand DNA (nick, lanes 7, 8). Membranes were analyzed by fluorometry (Odyssey 650nm, left panel) and proteins stained with amidoblack (right panel). L: Molecular weight ladder. B. Interaction of HMG2L1 with DNA visualized by fluorescence anisotropy. Polarization of Alexa680-Flap5' fluorescence in absence (lane 1) or presence (lane 2) of HMG2L1. C. Interaction between GFP-HMG2L1 full length or deletion constructs and DNA. The indicated GFP-tagged HMG2L1 constructs (lanes 3-9) or GFP alone (lane 2) were overexpressed in HEK293T cells, recovered by GFP-Trap and incubated with Alexa680-Flap5'. After extensive washes, fluorescence emitted by GFP constructs and Alexa680 were measured on Odyssey and compared to that of the GFP-alone sample (lane 2). Lane 1: negative control GFP-trap beads incubated with DNA probe in the absence of cell lysate. D. EMSA analyses showing HMG2L1 binding to DNA. Increasing concentrations of HMG2L1 as indicated (lanes 2-5) were incubated with Alexa680-Flap5' (5 nM) for 15 min at RT. The complexes of HMG2L1 with DNA and free DNA (lane 1) were separated by 1% native agarose gel electrophoresis and observed by fluorometry on Odyssey. E. HMG2L1 binding to DNA is inhibited by PAR. Increasing concentrations of PAR (lanes 3-5) were pre-mixed with Alexa680-Flap5' (5 nM) before addition of HMG2L1 (lanes 2-9) or no protein (lane 1) and incubation for 15 min at RT. The complexes of HMG2L1 with DNA and free DNA were analyzed as in D.

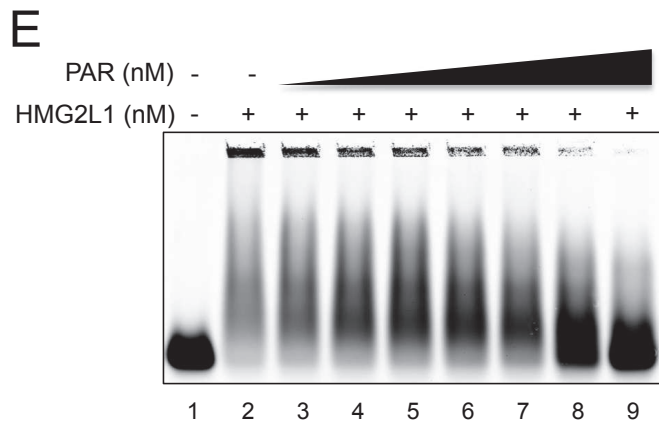
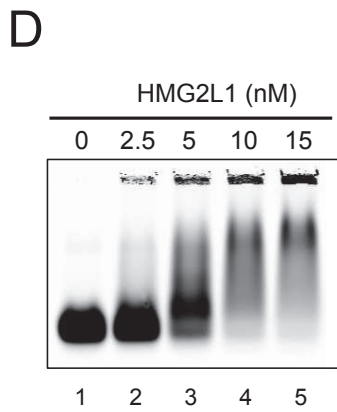
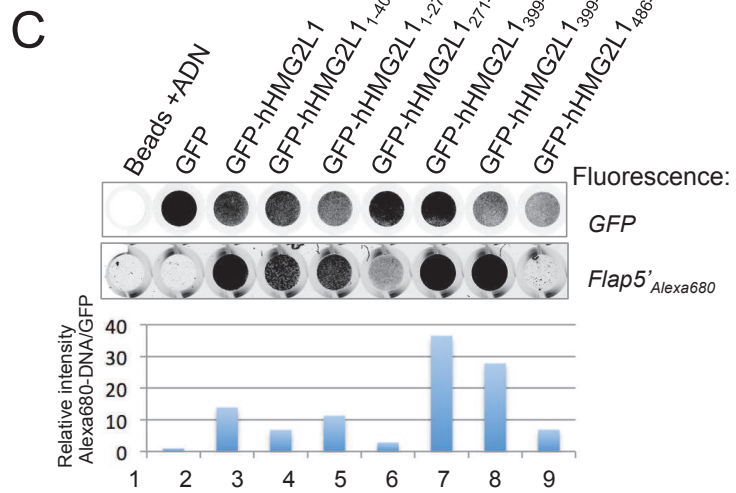
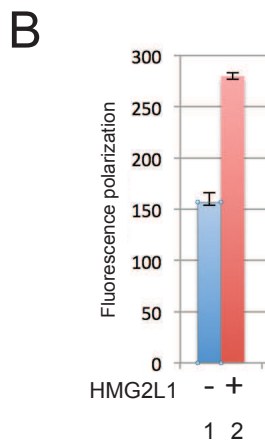
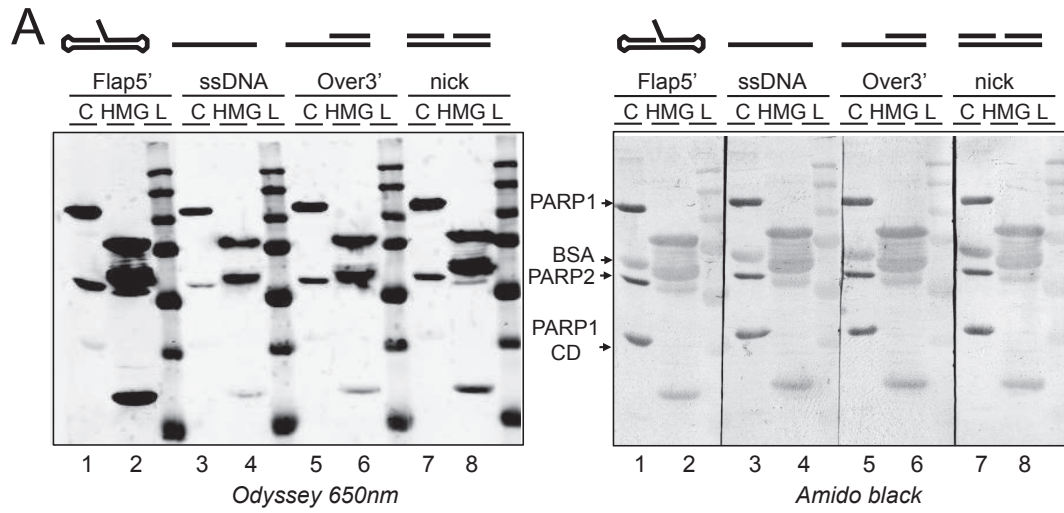


Figure 7: HMG2L1 is a RNA-chaperone regulated by PAR

A. Northwestern blot analysis revealing that HMG2L1 binds RNA. 6His-HMG2L1 (HMG, 2 μ g, lane 1) and a mixture of positive (PARP-1, PARP-2, 500 ng) and negative (BSA, PARP-1 catalytic domain CD, 1 μ g) controls (C, lane 2) were separated on SDS-10%PAGE, transferred to nitrocellulose membranes, renatured and incubated with the Alexa680-labelled RNA structure indicated above. The membrane was analyzed by fluorometry (Odyssey 650nm). L: Molecular weight ladder. B. Interaction between GFP-HMG2L1 full length or deletion constructs and RNA. The indicated GFP-tagged HMG2L1 constructs (lanes 4-10), GFP alone (lane 3) or GFP-MLN51 (lane 1) were overexpressed in HEK293T cells, recovered by GFP-Trap and incubated with Alexa680-RNA probe. After extensive washes, fluorescence emitted by GFP constructs and Alexa680 were measured on Odyssey and compared to that of the GFP-alone sample (lane 3). Lane 2: negative control GFP-trap beads incubated with the RNA probe in the absence of cell lysate. C. EMSA analyses of HMG2L1 binding to RNA. Increasing concentrations of HMG2L1 as indicated (lanes 2-5) were incubated with Alexa680-RNA (5 nM) for 15 min at RT or +0°C. The complexes of HMG2L1 with RNA and free RNA (lane 1) were separated by 1% native agarose gel electrophoresis and observed by fluorometry on Odyssey. D. Kinetics showing accumulation of RNA structure II from RNA structure I in the presence (HMG) and absence (-) of HMG2L1, after incubation for the indicated time at 0°C (upper panel) or at +22°C (lower panel) The complexes of HMG2L1 with RNA and free RNA were analyzed as in C. E. Structure and free energy of a monomer (structure I) and dimer (structure II) established using RNAfold software. F. HMG2L1 binding to DNA is inhibited by PAR. Increasing concentrations of PAR (lanes 3-5) were pre-mixed with Alexa680-RNA (5 nM) before addition of HMG2L1 (lanes 2-9) or no protein (lane 1) and incubation for 15 min at 0°C. The complexes of HMG2L1 with RNA and free RNA were analyzed as in C.

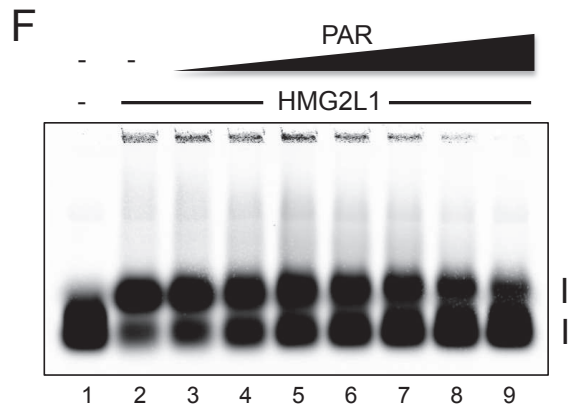
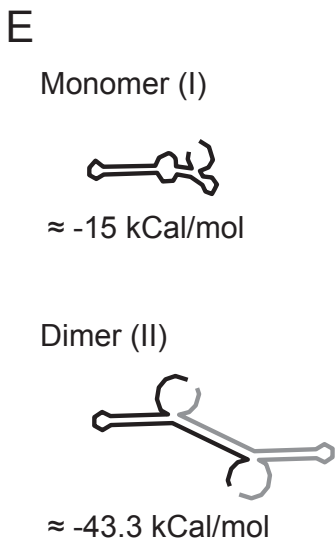
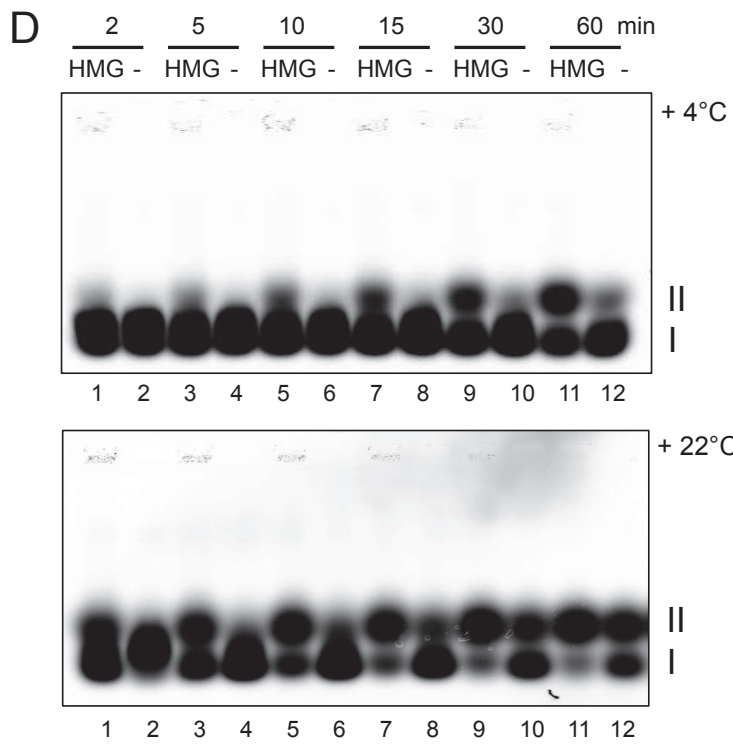
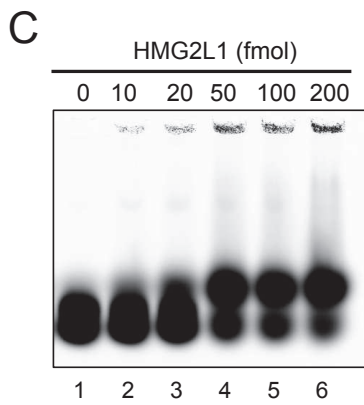
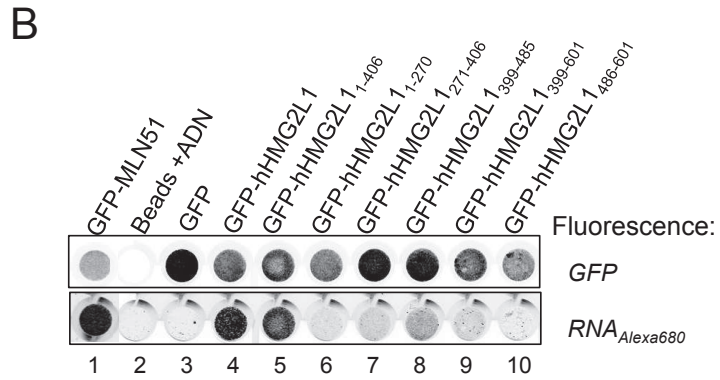
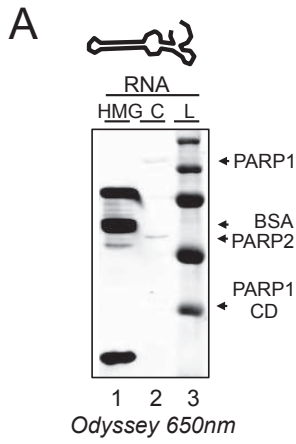
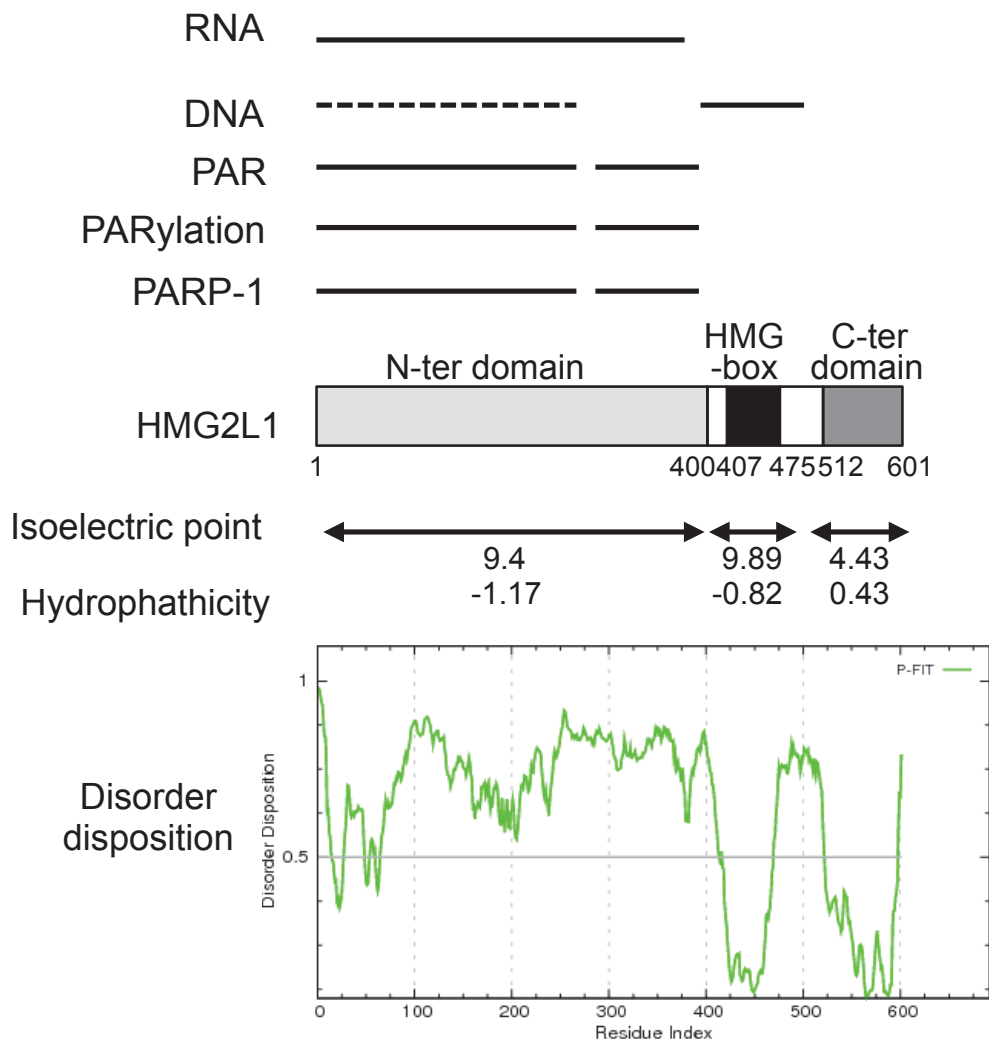


Figure 8: summary of HMG2L1 interactions with PARP-1, PAR and nucleic acids and biophysical properties of the protein

The regions of HMG2L1 interacting with PARP-1, PAR, DNA, RNA and PARylated are depicted. Sequence analyses were performed with ProtParam software (ExpASY Bioinformatic Resource portal, Artimo et al., 2012) to calculate the isoelectric point and hydrophathicity (GRAVY) of residues 1-400, 401 to 511 and 512 to 601. The disorder disposition was established using PONDR-fit program (Indiana University).



SUPPLEMENTARY TABLE 1: Proteins copurified with GFP-HMG2L1, GFP-HMG2L1₁₋₄₈₅, ± PARP inhibitor (KuDos) identified in LC/MS/MS experiment with at least 3 different peptides, and confirmed in the 2 MudPit experiments. Listed according to the number of peptides identified. For clarity, the ribosomal subunits identified are not shown here

For each protein, the rows correspond to:

1st row: LC/MS/MS experiment

2nd row: Mudpit experiment 1

3rd row: Mudpit experiment 2

x/y: x: number of peptides identified in the GFP-HMG2L1 sample

y: the number of peptides identified in the control GFP sample

PSM: total number of peptides

pept: number of different peptides

*Previously identified as interacting with PAR, PARP-1, PARP-2 or PARG in published proteomics (Gagné et al., 2003; Gagné et al., 2008; Isabelle et al., 2010)

AA: number of aminoacids

localisation: No: nucleolus; Nuc: nucleus, Cyto: cytoplasmic

function: taken from GenCards

	GFP-HMG2L1 ₁₋₄₈₅		GFP-HMG2L1 ₁₋₄₈₅ +Kudos		GFP-HMG2L1		Interaction with*	AA	localisation	Function (according to GeneCards)
	PSM	pept	PSM	pept	PSM	pept				
DDX21	100 43 14	26 14 8	95 15/6	28 6/4	43	17	PAR	783	No	DEAD-containing RNA helicase. Can unwind double-stranded RNA (helicase) and can fold or introduce a secondary structure to a single-stranded RNA (foldase). Functions as cofactor for JUN-activated transcription. Involved in rRNA processing
HNRNPM	70 22/3 2	29 4/2 1	54 2	24 1	34	17	PARP-1, PARP-2, PARG PAR	730	Nuc, No	Pre-mRNA binding protein in vivo, binds avidly to poly(G) and poly(U) RNA homopolymers in vitro. Involved in splicing. Acts as a receptor for carcinoembryonic antigen in Kupffer cells, may initiate a series of signaling events leading to tyrosine phosphorylation of proteins and induction of IL-1 alpha, IL-6, IL-10 and TNFalpha cytokines
HNRNPU	58 26 38	15 13 10	56 9	14 3	55	11	PARP-1, PARP-2, PARG PAR	825	Nuc, Cytoplasmic mRNP granules	Component of the CRD-mediated complex that promotes MYC mRNA stabilization. Binds to pre-mRNA. Has high affinity for scaffold-attached region (SAR) DNA. Binds to double- and single-stranded DNA and RNA. Involved in the packaging of hnRNA into large ribonucleoprotein complexes
DHX9	59 13/1 11	23 7/1 6	40 8/2	20 4/2	32	11	PARP-1 PARG PAR	1270	Nuc, Cyto	DEAH-containing RNA helicase. Can unwind double-stranded RNA and DNA-RNA complexes. Functions as a transcriptional activator. Component of the CRD-mediated complex that promotes MYC mRNA stability. Phosphorylé ATM
DDX5	18 5 1	8 3 1	13 4	5 2	4	3	PARP-2 PARG, PAR	614	Nuc, No, spliceosome	Involved in the alternative regulation of pre-mRNA splicing; its RNA helicase activity is necessary for increasing tau exon 10 inclusion and occurs in a RBM4-dependent manner. Binds to the tau pre-mRNA in the stem-loop region downstream of exon 10. The rate of ATP hydrolysis is highly stimulated by single-stranded RNA
NCL	26 3/1 6	8 3/1 5	16 6/4	7 4/3	25	9	PARP-1 PARP-2 PARG PAR	710	Nuc, No, Cyto, mRNP cytoplasmic granules	major nucleolar protein of growing eukaryotic cells. It is found associated with intranucleolar chromatin and pre-ribosomal particles. It induces chromatin decondensation by binding to histone H1. It is thought to play a role in pre-rRNA transcription and ribosome assembly. May play a role in the process of transcriptional elongation. Binds RNA oligonucleotides
DDX1	20 16 3	13 5 3	20 -	9 -	20	7	PAR	740	Nuc, Cyto, Stress granules, relocalizes to IRIF	ATP-dependent RNA helicase, able to unwind both RNA-RNA and RNA-DNA duplexes. Possesses 5' single-stranded RNA overhang nuclease activity and ATPase activity on various RNA, but not DNA polynucleotides. May play a role in RNA clearance at DNA double-strand breaks (DSBs), thereby facilitating the template-guided repair of transcriptionally active regions of the genome. Coactivator of NF-kappa-B. Positive transcriptional regulator of cyclin CCND2 expression. Binds to poly(A) RNA. May be involved in 3'-end cleavage and polyadenylation of pre-mRNAs. Relocalized at sites of DNA double-strand breaks (DSBs) in an ATM-dependent manner after IR treatment
ILF3	32 4/2 6	14 3/1 3	20 1	7 1	17	6	PARG PAR	894	Nuc, No, Cytoplasmic mRNP granules	interleukin enhancer binding factor 3. Double-stranded RNA (dsRNA) binding protein that complexes with other proteins, dsRNAs, small noncoding RNAs, and mRNAs to regulate gene expression and stabilize mRNAs. This protein was first discovered to be a subunit of the nuclear factor of activated T-cells (NFAT). May facilitate double-stranded RNA-regulated gene expression at the level of post-transcription. Can act as a translation inhibitory protein which binds to coding sequences. Can promote the formation of stable DNA-PK holoenzyme complexes on DNA with Ku
PDCD11	17 9 6	14 5 4	14 1/2	12 1/2	-	-	PAR	1871	Nuc, No	Essential for the generation of mature 18S rRNA, specifically necessary for cleavages at sites A0, 1 and 2 of the 47S precursor. Directly interacts with U3 snoRNA. NFkB binding,
C22orf28	30 4 2	12 4 2	19 -	9 -	24	9		505	Cyto	Catalytic subunit of the tRNA-splicing ligase complex that acts by directly joining spliced tRNA halves to mature-sized tRNAs by incorporating the precursor-derived splice junction phosphate into the mature tRNA as a canonical 3',5'-phosphodiester. May act as a RNA ligase with broad substrate specificity, and may function toward other RNAs

	GFP-HMG2L1 ₁₋₄₈₅		GFP-HMG2L1 ₁₋₄₈₅ +Kudos		GFP-HMG2L1		Interaction with*	AA	localisation	Function (according to GeneCards)
	PSM	pept	PSM	pept	PSM	pept				
NOP2	25 4/1 10	13 4/1 9	15 5	9 1	2	2	PAR	812	No, Nuc	May play a role in the regulation of the cell cycle and the increased nucleolar activity that is associated with the cell proliferation. May act as ribosomal RNA methyltransferase
FBL	14 3 4	7 2 2	9 -	5 -	5	4	PAR	321	Nuc, No, snoRNP	Component of a nucleolar small nuclear ribonucleoprotein (snRNP) involved in the first step of preribosomal RNA processing. It is associated with the U3, U8, and U13 small nuclear RNAs and is located in the dense fibrillar component (DFC) of the nucleolus. Involved in pre-rRNA processing. Utilizes the methyl donor S-adenosyl-L-methionine to catalyze the site-specific 2'-hydroxyl methylation of ribose moieties in pre-ribosomal RNA. Site specificity is provided by a guide RNA that base pairs with the substrate. Methylation occurs at a characteristic distance from the sequence involved in base pairing with the guide RNA
HNRNPC	20 285 36	6 8 15	12 32	6 3	-	-	PARP-1 PAR	306	Nuc, spliceosome	Binds pre-mRNA and nucleates the assembly of 40S hnRNP particles. Single HNRNPC tetramers bind 230-240 nucleotides. Trimers of HNRNPC tetramers bind 700 nucleotides. May play a role in the early steps of spliceosome assembly and pre-mRNA splicing. Interacts with poly-U tracts in the 3'-UTR or 5'-UTR of mRNA and modulates the stability and the level of translation of bound mRNA molecules. Interacts with IGF2BP1
HNRNPR	7 3/1 5	6 2/1 3	9 1	4 1	5	3	PAR	633	Nuc, Cyto, Cytoplasmic mRNP granules	Component of ribonucleosomes, which are complexes of at least 20 other different heterogeneous nuclear ribonucleoproteins (hnRNP). hnRNP play an important role in processing of precursor mRNA in the nucleus
HNRNPH1	5 11 6	3 3 4	3 -	3 -			PAR	449	Nuc, spliceosome	This protein is a component of the heterogeneous nuclear ribonucleoprotein (hnRNP) complexes which provide the substrate for the processing events that pre-mRNAs undergo before becoming functional, translatable mRNAs in the cytoplasm. Mediates pre-mRNA alternative splicing regulation. Inhibits, together with CUGBP1, insulin receptor (IR) pre-mRNA exon 11 inclusion in myoblast. Binds to the IR RNA. Binds poly(RG)
HNRNPA2B1	10 41 27	4 4 9	8 5/13	3 2/6	7	2	PARG PAR	353	Nuc, spliceosome, Cytoplasmic mRNP granules	Involved with pre-mRNA processing. Forms complexes (ribonucleosomes) with at least 20 other different hnRNP and heterogeneous nuclear RNA in the nucleus
HNRNPA3	10 4 7	5 3 4	14 8	4 2	10	4	PAR	378	Nuc, spliceosome	Plays a role in cytoplasmic trafficking of RNA. Binds to the cis-acting response element, A2RE. May be involved in pre-mRNA splicing
PRPF8	7 1/2 8	7 1/2 6	10 1	7 1	3	3	PAR	2335	Nucleus speckles	Central component of the spliceosome, which may play a role in aligning the pre-mRNA 5'- and 3'-exons for ligation. Interacts with U5 snRNA, and with pre-mRNA 5'-splice sites in B spliceosomes and 3'-splice sites in C spliceosomes
SFRS1	13 14 36	7 3 10	7 1	5 1	-	-	PAR	248	Nuc, Cyto, nucleus speckles	ASF-1. Ser/Arg splicing factor. Role in preventing exon skipping, ensuring the accuracy of splicing and regulating alternative splicing. Interacts with other spliceosomal components, via the RS domains, to form a bridge between the 5'- and 3'-splice site binding components, U1 snRNP and U2AF. Can stimulate binding of U1 snRNP to a 5'-splice site-containing pre-mRNA. Binds to purine-rich RNA sequences.
NPM1	6 62 14	4 4 5	3	2	2	2	PARP-1 PARP-2 PAR	294	Nuc, No, Cyto, centrosome	ribosome biogenesis, centrosome duplication, protein chaperoning, histone assembly, cell proliferation, and regulation of tumor suppressors p53/TP53 and ARF. Binds ribosome presumably to drive ribosome nuclear export. Associated with nucleolar ribonucleoprotein structures and bind single-stranded nucleic acids. Acts as a chaperonin for the core histones H3, H2B and H4. Stimulates APEX1 endonuclease activity on apurinic/apyrimidinic (AP) double-stranded DNA but inhibits APEX1 endonuclease activity on AP single-stranded RNA. May exert a control of APEX1 endonuclease activity within nucleoli devoted to repair AP on rDNA and the removal of oxidized rRNA molecules. In concert with BRCA2, regulates centrosome duplication. Regulates centriole duplication: phosphorylation by PLK2 is able to trigger centriole replication
GNL3	7 4 6	4 4 2	4 5	3 1	4	2	PAR	549	Nuc, No	Guanine nucleotide binding protein-like 3 (nucleolar), nucleostemin. May be required to maintain the proliferative capacity of stem cells and may play an important role in tumorigenesis
RBMX	7 10 17	3 6 7	9 -	3 -			PARP-2 PAR	391	Nuc, Spliceosome, Nuclear granules	RNA-binding protein, role in the regulation of pre- and post-transcriptional processes. Implicated in tissue-specific regulation of gene transcription and alternative splicing of several pre-mRNAs. Associates with nascent mRNAs. Component of the supraspliceosome complex that regulates pre-mRNA alternative splice site selection. Can either activate or suppress exon inclusion. Binds non-specifically to pre-mRNAs.

	GFP-HMG2L1 ₁₋₄₈₅		GFP-HMG2L1 ₁₋₄₈₅ +Kudos		GFP-HMG2L1		Interaction with*	AA	localisation	Function (according to GeneCards)
	PSM	pept	PSM	pept	PSM	pept				
PRPF4B	5	4	8	7	1	1		1007	Nuc, spliceosome	Serine/threonine-protein kinase PRP4 homolog Role in pre-mRNA splicing. Phosphorylates SF2/ASF
	6	5	-	-						
	6	5								

2. Résultats

2.1. HMG2L1 est une protéine intrinsèquement désordonnée

Avant d'aller plus loin dans la caractérisation de HMG2L1, nous voulions en savoir plus sur sa composition, sa structure modulaire et ses caractéristiques biochimiques. Dans un premier temps, nous avons constaté la forte basicité de la protéine et calculé un point isoélectrique d'environ 10. En observant plus précisément la séquence protéique de HMG2L1 (1-601), nous nous sommes rendu compte que la protéine contient 15% de lysine – soit l'acide aminé principal – dont la majorité est localisée dans la partie N-terminale (1-406). De plus, la prédiction de structures secondaires à l'aide d'un logiciel nous a permis de montrer que ce domaine est dans sa quasi totalité intrinsèquement désordonné, c'est-à-dire qu'il ne prend aucune structure secondaire particulière (**figure 24**).

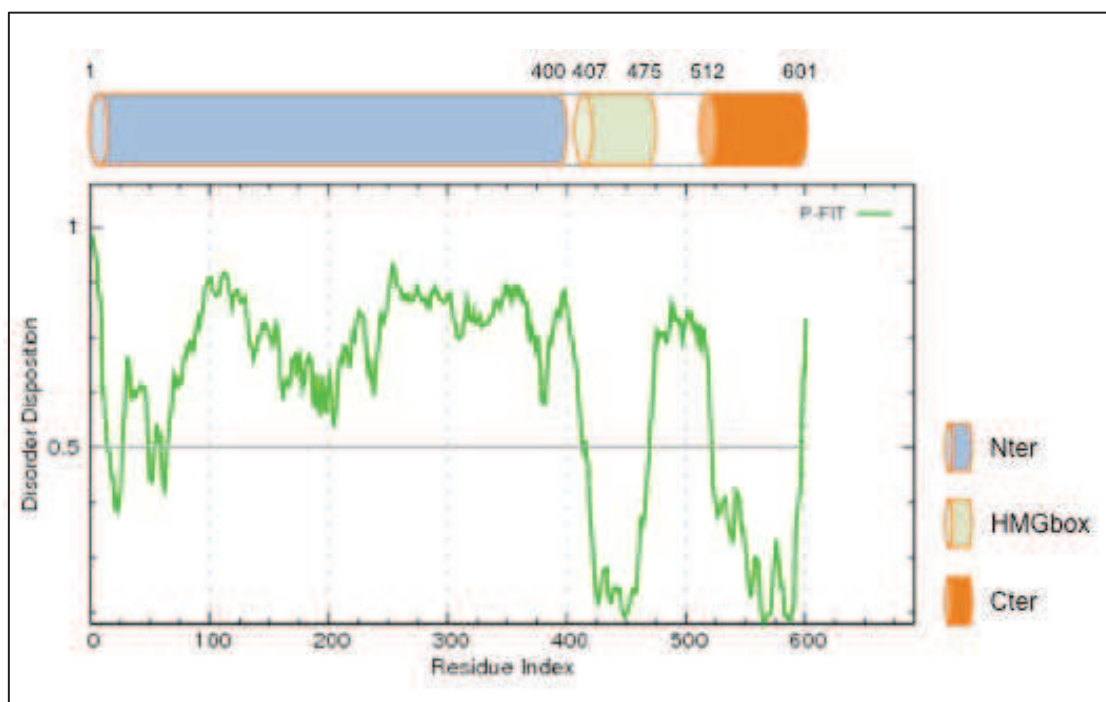


Figure 24 : HMG2L1 est intrinsèquement désordonnée.

Le logiciel de prédiction de désordre structural protéique Pondr-fit permet de détecter une forte absence de structure secondaire dans la partie N-terminale de HMG2L1. Au contraire, les domaines HMG-box et C-terminal possèdent une structure secondaire définie (<http://www.disprot.org/pondr-fit.php>).

Ces régions dites désordonnées sont de mieux en mieux décrites dans la littérature et il s'avère qu'elles représentent en moyenne de 15 à 45% des protéines (Tompa, 2012). Ces régions sont caractérisées par une faible hydrophatie – empêchant la structuration de la protéine autour d'un cœur hydrophobe – et une forte charge électrostatique – conduisant à des phénomènes de répulsion électrostatiques – correspondant parfaitement au domaine N-terminal de HMG2L1 (Uversky, 2011).

Des études montrent que ces régions jouent des rôles importants dans des processus de régulation ou de signalisation. En effet, l'absence de structure secondaire définie leur confère de multiples potentialités d'interactions dues au fort dynamisme de ces régions. En revanche, leur forte exposition au solvant les rend vulnérables aux protéases. De même, ces régions sont propices au phénomène d'agrégation qui peut poser problème au moment de la purification par exemple (Dyson and Wright, 2005).

2.2. HMG2L1 contient un domaine HMG

Comme nous l'avons vu auparavant, HMG2L1 ne contient qu'un seul domaine répertorié dans les bases de données regroupant les domaines protéiques : un domaine HMG (407-475). Elle appartient au groupe des protéines à boîte HMG (HMBG) caractérisé par la présence d'un ou plusieurs domaines HMG d'environ 75 acides aminés. Ces domaines sont capables de lier l'ADN de manière séquence-dépendante (classe I) ou -indépendante (classes II/III) et sont impliqués dans la régulation de la transcription ou l'organisation du génome. Nous avons donc voulu prédire le mode d'interaction à l'ADN de HMG2L1. Pour cela, nous avons comparé son domaine HMG à celui des autres protéines humaines à HMG et construit le dendrogramme correspondant (**figure 25**). Ceci nous a permis de classer HMG2L1 parmi les protéines à HMG de classe II/III contenant entre autres SSRP1, SP100, UBF ou encore HMG-1 (Stros et al., 2007). Ce groupe contient principalement des protéines avec au moins 2 domaines HMG, tandis que HMG2L1 n'en contient qu'un seul. Toutefois, SSRP1 appartient également à cette classe et ne contient qu'un seul motif HMG. Nous pouvons d'ailleurs établir un parallèle entre ces deux protéines puisqu'elles appartiennent toutes deux à des complexes de remodelage de la chromatine (SSRP1 à FACT et HMG2L1 à NURF) et qu'en outre nous savons que l'activité de FACT est directement régulée par PARP-1 et son activité enzymatique (Huang et al., 2006; Vicent et al., 2011). Elles ne contiennent ainsi qu'un seul

domaine HMG qui lie tout de même l'ADN de manière séquence-indépendante au contraire de la classe I.

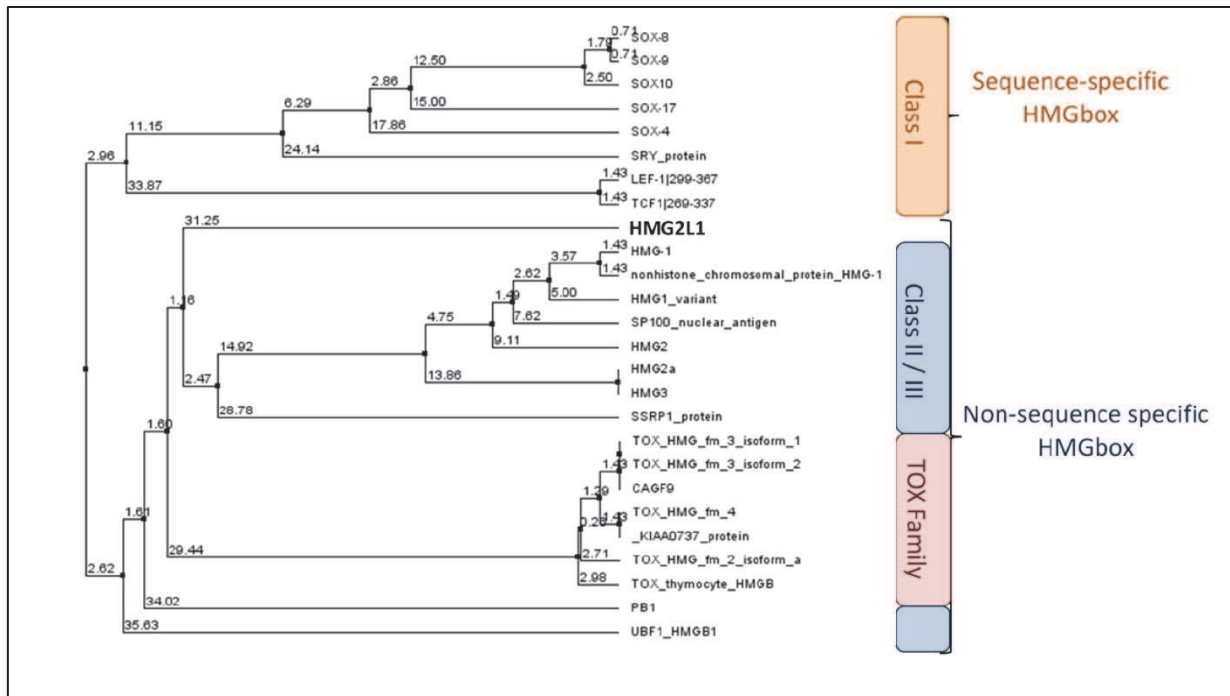


Figure 25 : HMG2L1 appartient à la classe II/III

Les séquences des motifs HMG de 26 protéines humaines ont été récupérées et alignées par le logiciel d'alignement multiple COBALT disponible sur le site du NCBI. Le dendrogramme a été généré à l'aide de Jalview.

2.3. HMG2L1 contient un domaine C-terminal inconnu ultra-conservé

Enfin, nous avons pu mettre à jour un domaine spécifique à HMG2L1 localisé en C-terminal (512-601). En effet, les alignements multiples réalisés sur les protéines orthologues de HMG2L1 ont permis de détecter une région fortement conservée de la drosophile jusqu'à l'homme (**figure 26**).

Ce nouveau domaine ultra-conservé est également spécifique à HMG2L1 puisqu'il n'est pas répertorié dans les bases de domaines conservés. Cette région a été utilisée pour réaliser un blast et seules les protéines orthologues HMG2L1 sortent avec une e-value très élevée. Il diffère du reste de la protéine car il semble être fortement structuré, mais également car il a un pHi plutôt acide, de l'ordre de 6. Comme nous le verrons plus tard, sa présence

dans la protéine lui confère une forte toxicité quand elle est surexprimée, ce qui démontre qu'il a certainement une fonction importante et ce qui expliquerait ainsi sa forte conservation.

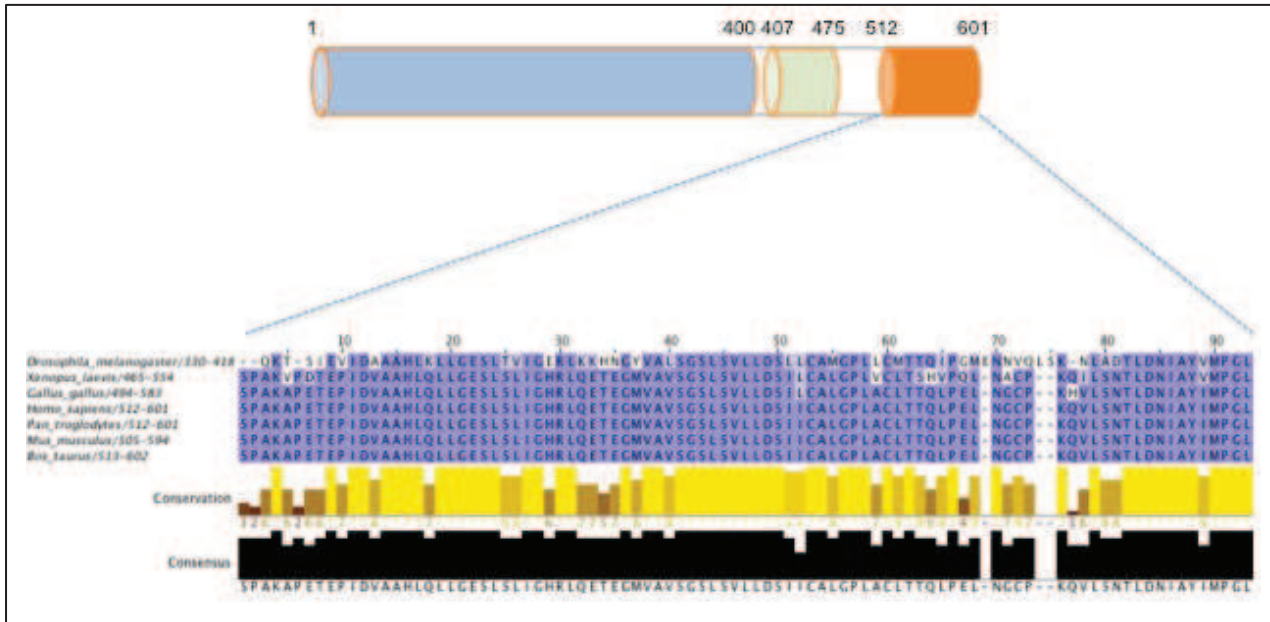


Figure 26 : HMG2L1 contient un domaine C-ter très conservé

Alignement multiple montrant la forte conservation du domaine C-terminal (512-601) de HMG2L1 de la drosophile jusqu'à l'homme. Les séquences peptidiques des protéines HMG2L1 ont été récupérées et leur alignement a été réalisé par ClustalX, la mise en forme à l'aide de Jalview.

2.4. HMG2L1 interagit avec PARP-1 et le PAR et est poly(ADP-ribosyl)ée

Nous avons donc débuté ce projet à partir d'une seule donnée, l'interaction probable entre HMG2L1 et PARP-1. En effet, l'expérience de double-hybride menée au laboratoire a permis de sortir 2 clones distincts avec des séquences chevauchantes codant pour HMG2L1 (**publication 2, figure 1.A**). Nous en avons déterminé une région minimale d'interaction avec PARP-1 nommée Inter (271-406). Nous avons donc voulu confirmer ce résultat et aller plus loin dans la caractérisation de cette interaction.

A l'aide d'immunoprécipitations effectuées *ex-vivo* à partir d'extraits de cellules simiesques COS-1 surexprimant la protéine HMG2L1-HA, nous avons pu confirmer l'interaction et montrer qu'elle résiste à de fortes stringences en sels (i.e. 400 mM NaCl ; voir

publication 2, figure 1.B). Les formes tronquées de HMG2L1 en fusion avec la GFP ont été exprimées dans des cellules humaines HEK-293T et nous avons procédé à une immunoprécipitation à l'aide du système GFP-trap. Nous avons pu observer la co-immunoprécipitation de PARP-1 uniquement via la partie N-terminale de HMG2L1 (1-406) (**voir publication 2, figures 1.C et 1.D**). Il faut souligner que c'est déjà via ce domaine N-terminal que HMG2L1 interagit avec la myocardine et la SB transposase, il constituerait donc une véritable plateforme d'interactions protéiques (Walisko et al., 2008; Zhou et al., 2010).

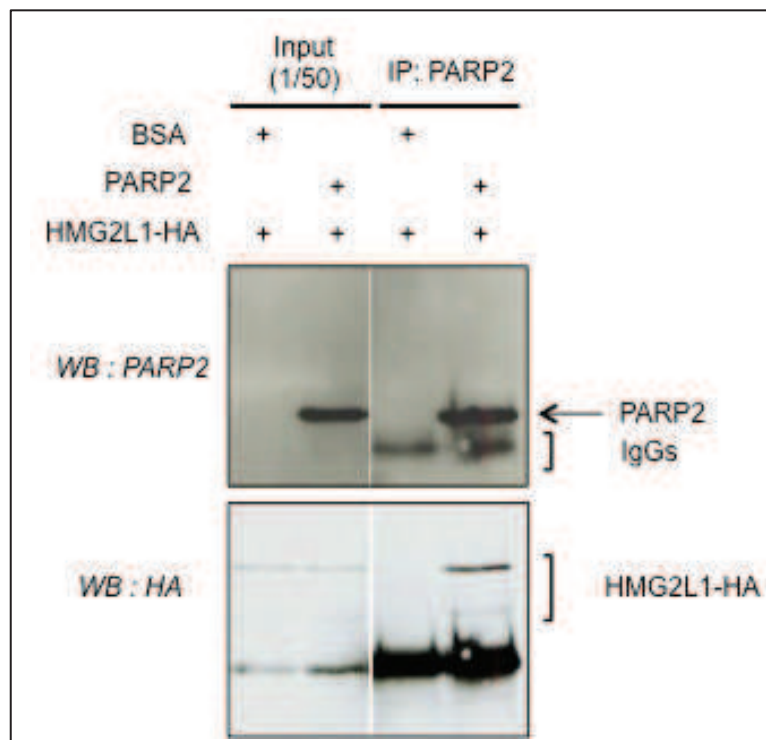


Figure 27 : HMG2L1 interagit avec PARP-2 *in vitro*

La protéine HMG2L1-HA traduite *in vitro* a été incubée avec la BSA (lignes 1 et 3) ou avec la protéine recombinante PARP-1 (lignes 2 et 4). Une immunoprécipitation a été réalisée à l'aide d'un anticorps anti PARP-1 et la co-immunoprécipitation de HMG2L1-HA a été testée par western-blot à l'aide d'un anticorps anti HMG2L1. L'immunoprécipitation de PARP-1 a été vérifiée avec un anticorps anti PARP-1.

Enfin, nous avons produit HMG2L1-HA *in vitro* par transcription/traduction dans des réticulocytes de lapin et procédé à des immunoprécipitations en présence de la protéine recombinante hPARP-1 purifiée au laboratoire. Nous avons pu confirmer l'interaction directe entre les deux protéines (**publication 2, figure 1.E**). Nous avons également pu montrer l'interaction entre HMG2L1 et la protéine recombinante mPARP-2 *in vitro*, cette interaction

semblant même plus forte que pour hPARP-1 (**figure 27**). A noter que nous avons également pu montrer que HMG2L1 interagit avec PARP-2 *in vivo* à l'aide d'immunoprécipitations à partir de cellules HeLa (**publication 2, figure 5.C**). Ces résultats indiquent que HMG2L1 interagit non seulement avec PARP-1 mais également avec PARP-2.

Afin de déterminer si HMG2L1 est poly(ADP-ribosyl)ée par PARP-1, nous avons incubé les protéines recombinantes HMG2L1 (voir chapitre II) et hPARP-1 purifiées au laboratoire en présence de ^{32}P -NAD. L'autoradiographie a révélé l'hétéromodification de HMG2L1 (**publication 2, figure 2.A**). De même, la protéine recombinante mPARP-2 est capable de poly(ADP-ribosyl)er HMG2L1 *in vitro* (**figure 28**). Afin de localiser le domaine hétéromodifié, nous avons immunoprécipité les formes tronquées de HMG2L1 en fusion avec la GFP à partir de cellules HEK-293T. Nous avons alors incubé ces fusions avec la protéine recombinante hPARP-1 et du ^{32}P -NAD. L'autoradiographie nous a permis de montrer que la protéine est poly(ADP-ribosyl)ée au niveau de son domaine N-terminal (1-406) sur au moins deux sites distincts (**publication 2, figure 2.B**). La propension du domaine N-terminal à être modifié est expliquée par son caractère désordonné qui permettrait de donner plus facilement des sites accepteurs à PARP-1, au contraire d'un domaine fortement structuré (Dunker et al., 2002).

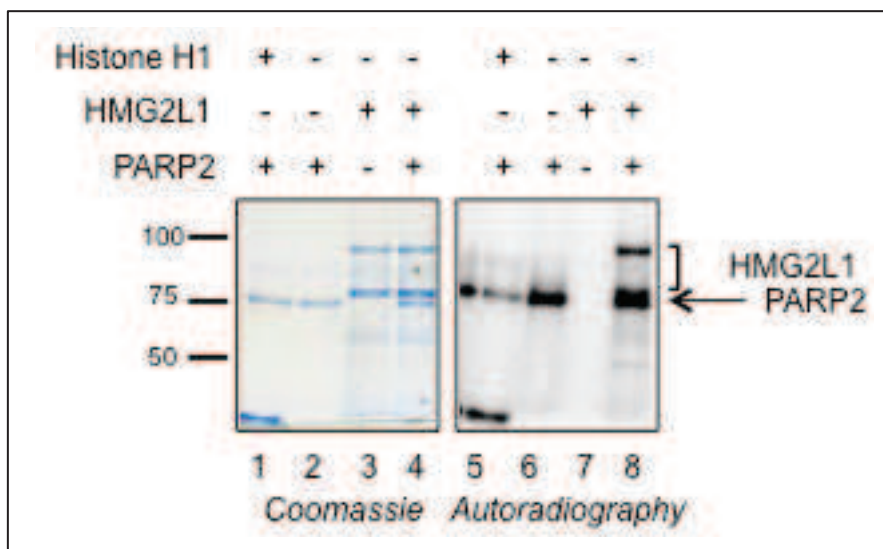


Figure 28 : PARP-2 hétéromodifie HMG2L1

La protéine purifiée 6his-HMG2L1 (300 ng) a été incubée avec 0 (lignes 3 et 7) ou 300 ng de PARP-2 (lignes 4 et 8) pendant 30 min à 25°C en présence de ^{32}P -NAD⁺ et d'ADN activé par la DNase I. En contrôle, PARP-1 a été incubée seule (lignes 2 et 6) ou avec 300 ng d'histone H1 (lignes 1 et 5). Les produits de réaction ont été séparés sur gel SDS-PAGE 10% et analysés par autoradiographie (panneau de droite) après coloration au bleu de Coomassie et séchage du gel (panneau de gauche).

Enfin, nous avons voulu déterminer si HMG2L1, protéine très basique (pI~10), était capable d'interagir avec le PAR libre. Pour cela, nous avons produit du PAR radioactif *in vitro* à l'aide de hPARP-1 recombinante et de ³²P-NAD. Les formes tronquées de HMG2L1 en fusion avec la GFP ont été séparées sur gel SDS-PAGE puis transférées sur membrane de nitrocellulose avant d'être renaturées. La membrane a alors été incubée avec le PAR radioactif et l'autoradiographie subséquente a permis de montrer que HMG2L1 interagit avec le PAR au niveau de son domaine N-terminal (1-406), confirmant son rôle de plateforme d'interaction (**publication 2, figure 2.D**).

2.5. HMG2L1 est localisée dans le nucléole

La deuxième question à laquelle nous avons voulu répondre concerne la localisation subcellulaire de HMG2L1. Pour cela nous avons transfecté des cellules humaines HeLa avec nos fusions GFP et observé la localisation nucléaire et nucléolaire de GFP-HMG2L1 (de même avec des fusions HMG2L1-HA ou GST-HMG2L1) (**publication 2, figure 3.A**). Nous avons alors procédé à des immunofluorescences en utilisant des marqueurs nucléolaires : UBF, PARP-1 et PARP-2. Il s'avère que GFP-HMG2L1 colocalise parfaitement avec UBF et partiellement avec PARP-1 et PARP-2 (**publication 2, figures 3.B et 3.C**). Parallèlement, nous avons pu montrer par immunoprécipitation que UBF interagit avec HMG2L1, à nouveau via son domaine N-terminal (**figure 29**). Ce résultat confirme encore un peu plus la fonction de plateforme d'interaction du domaine N-terminal de HMG2L1.

A l'aide d'observations au microscope à contraste de phase, nous avons pu confirmer cette localisation et montrer qu'elle dépend d'au moins deux NoLS localisés en Nter (1-270) et dans la région Inter (271-406) (**publication 2, figures 4.A et 4.B**). Nous avons alors recherché des séquences NoLS putatives à l'aide d'un logiciel de prédiction disponible sur internet et quatre éléments ont pu être identifiés (**figure 30** et www.compbio.dundee.ac.uk/www-nod/index.jsp) (Scott et al., 2011). Il est intéressant de noter que deux sont placés dans la partie Nter (1-270) et deux dans la partie Inter (271-406), ce qui expliquerait pourquoi ces deux régions en fusion avec la GFP s'accumulent dans le nucléole de manière indépendante.

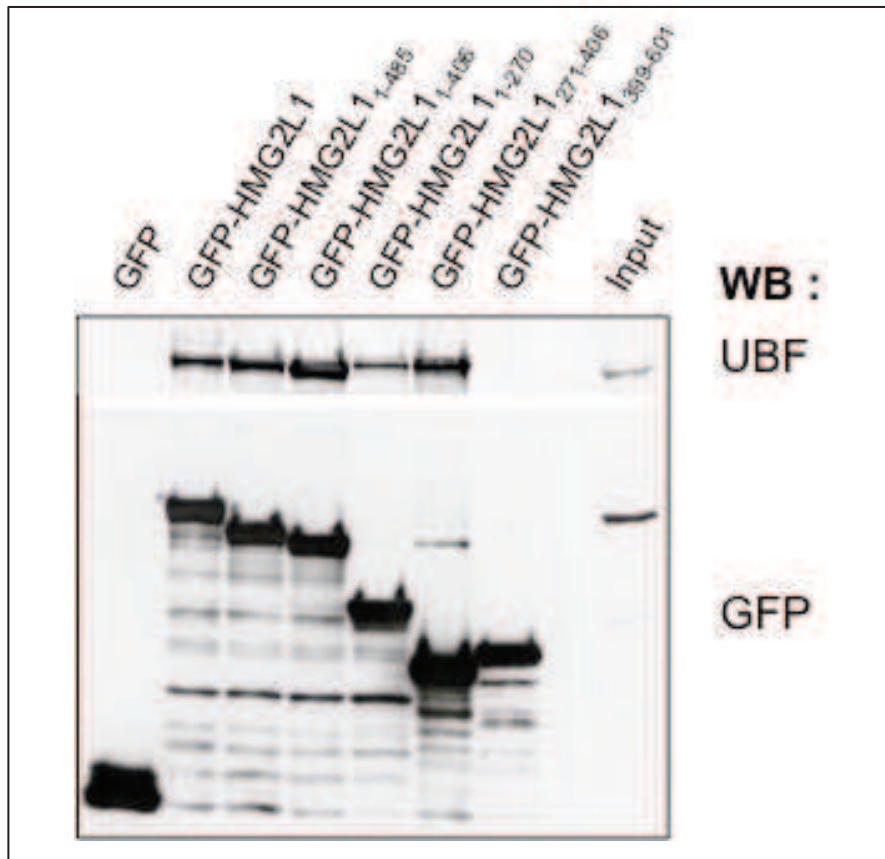


Figure 29 : HMG2L1 interagit avec UBF via son domaine N-terminal

Immunoprécipitations montrant l'interaction de la protéine UBF avec la partie N-terminale (1-406) de HMG2L1. Les formes tronquées de HMG2L1 ont été exprimées dans des cellules HEK293T et immunoprécipitées à l'aide de billes GFP-trap. La co-immunoprécipitation de UBF a été vérifiée par western-blot à l'aide d'un anticorps spécifique.

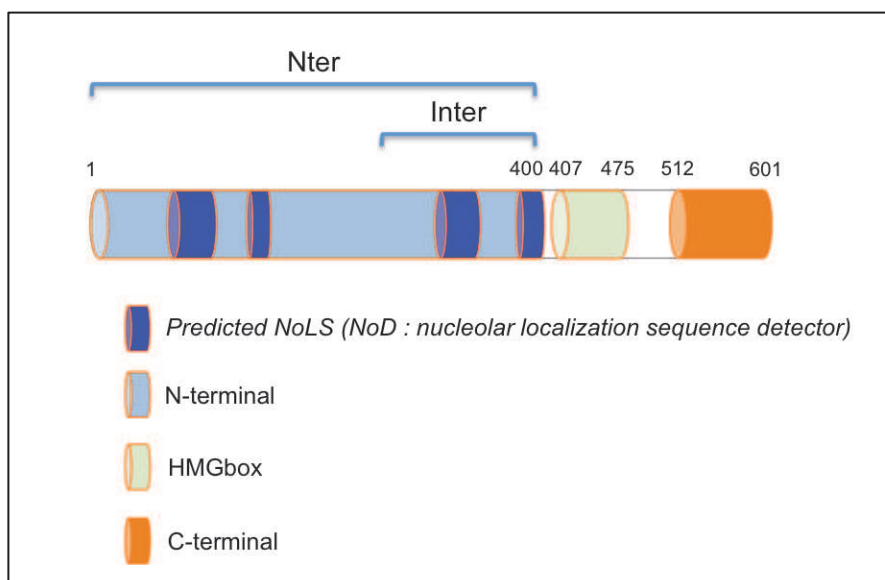


Figure 30 : HMG2L1 contient des NoLS putatifs.

La présence de NoLS putatifs dans HMG2L1 a été vérifiée à l'aide d'un logiciel de prédiction disponible sur internet (www.compbio.dundee.ac.uk/www-nod/index.jsp).

Nous avons remarqué un changement de distribution de GFP-HMG2L1 lorsque la protéine est fortement exprimée dans la cellule. GFP-HMG2L1 commence alors à se regrouper en foci dans lesquels se retrouvent également UBF, mais pas PARP-1 ni PARP-2. Nous avons aussi observé que le nucléole subit un stress lorsque la protéine est trop fortement exprimée. Ce stress entraîne alors la formation de structures de type *nucleolar caps* caractérisées par la migration de plusieurs protéines nucléolaires dans un « chapeau » à la périphérie du nucléole (**figure 31**). Ces structures sont observées lors de l'inhibition de la transcription des ADNr par une drogue comme l'actinomycine D ou lorsque l'ADNr est endommagé par des rayons UV par exemple (Boulon et al., 2010). En outre, le traitement des cellules à l'actinomycine D entraîne la formation de *nucleolar caps* où se retrouve également la protéine GFP-HMG2L1 (**publication 2, figures 3C et 3D**). Une transcription active des ADNr est donc nécessaire à l'accumulation nucléolaire de HMG2L1.

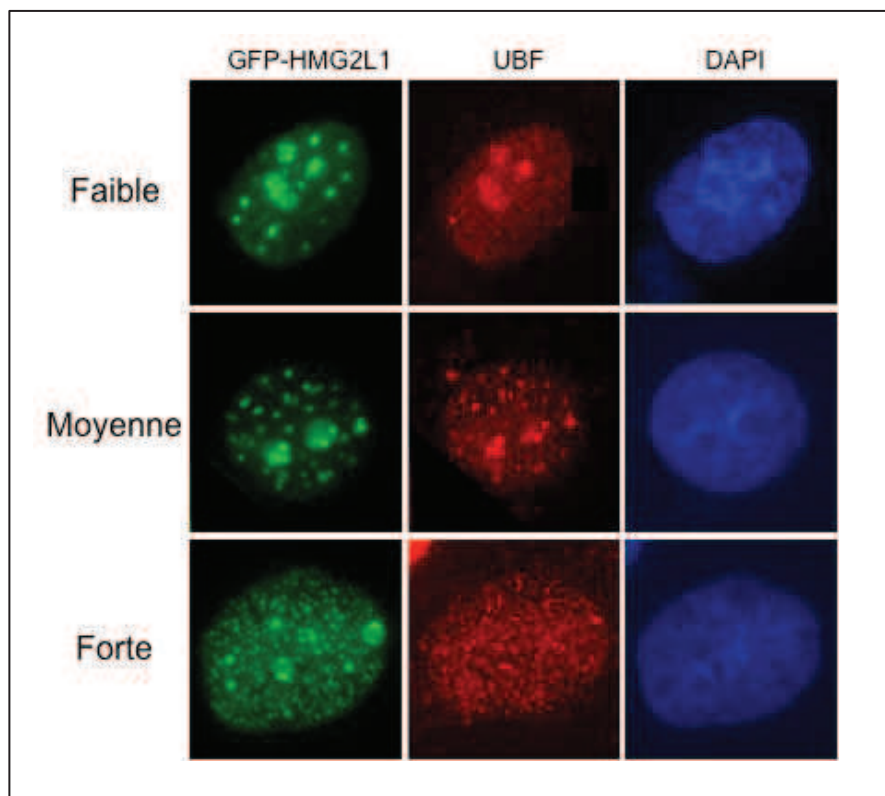


Figure 31 : HMG2L1 s'accumule dans le nucléole transcriptionnellement actif

Immunofluorescences montrant l'impact gradatif de la surexpression de GFP-HMG2L1 sur la localisation de UBF endogène. Du haut vers le bas, l'expression transitoire de GFP-HMG2L1 dans des cellules HeLa est de plus en plus forte. Les cellules ont été fixées avec 4% formaldéhyde et les noyaux ont été colorés au DAPI.

Durant la thèse, nous avons tenté d'établir à mainte reprise une lignée cellulaire stable exprimant la protéine GFP-HMG2L1. Cependant, l'expression de la protéine était perdue après plusieurs divisions cellulaires, même lorsque nous triions les cellules par FACS pour ne garder que les cellules GFP-positives. La localisation observée est toujours nucléaire et nucléolaire, même lors d'une expression transitoire faible (**figure 32**). L'expression de cette protéine semble donc toxique pour la cellule, ce qui n'est pas le cas de la protéine dépourvue du domaine C-terminal (1-485) pour laquelle nous avons pu établir une lignée stable (non montré). Ces résultats vont dans le sens d'une toxicité de la protéine entraînant un stress nucléolaire lorsqu'elle est surexprimée.

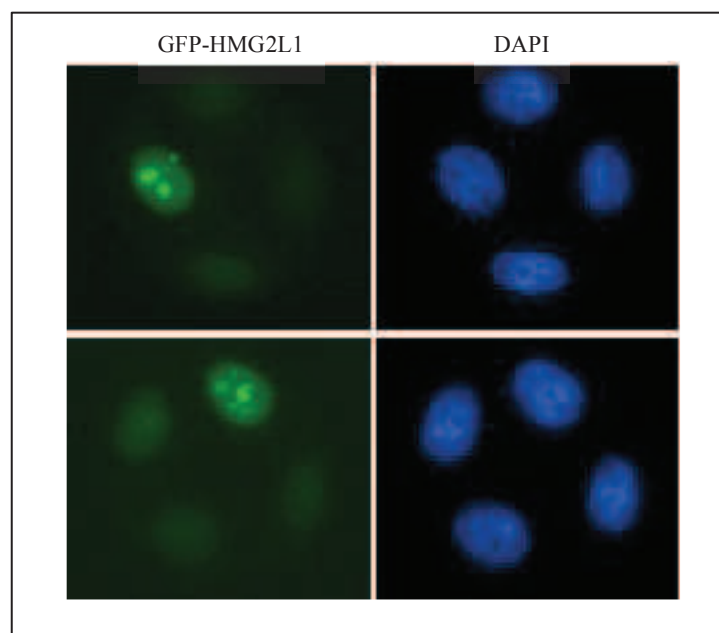


Figure 32 : Etablissement de la lignée stable GFP-HMG2L1

Images prises en microscopie à fluorescence et montrant les cellules HeLa exprimant de manière stable GFP-HMG2L1. Les cellules ont été fixées avec 4 % formaldéhyde et les noyaux ont été colorés au DAPI.

La surexpression de GFP-HMG2L1 induit un autre résultat surprenant. En effet, certaines protéines nucléolaires voient leur signal total diminuer en immunofluorescence. C'est le cas de PARP-2 et de UBF mais pas de DDX21 (**figure 33**). Le traitement des cellules avec un inhibiteur du protéasome n'a pas permis de restaurer le signal, ce qui signifie que les protéines ne sont pas envoyées vers la dégradation. D'autre part, par western-blot ou RT-qPCR, nous n'avons pas observé de diminution de la quantité de PARP-2 et UBF au niveau protéine et ARNm après sur-expression de GFP-HMG2L1 (non montrés). Nous n'avons pas, à ce jour, d'explications concernant cette observation.

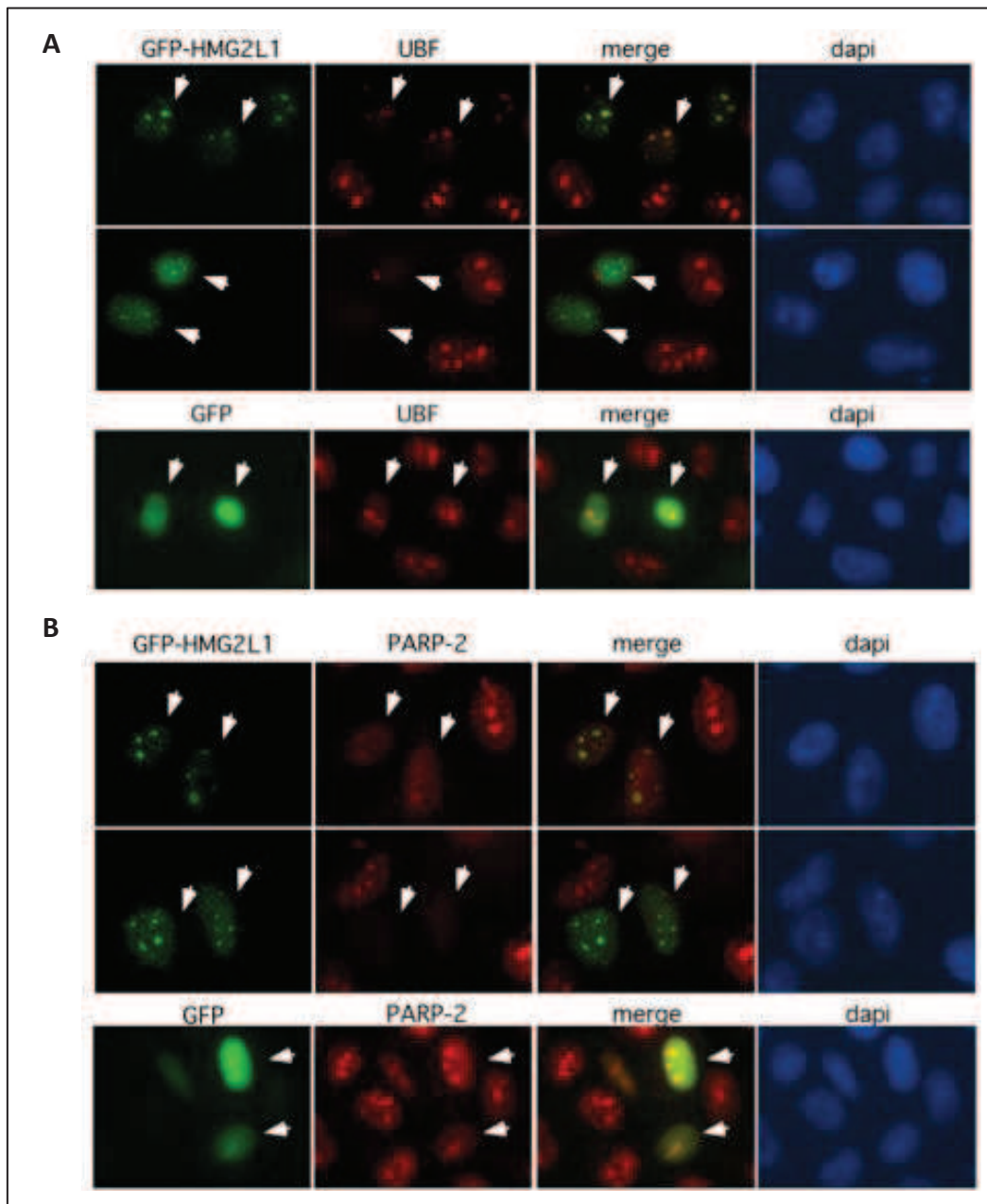


Figure 33 : la surexpression de GFP-HMG2L1 induit la diminution du niveau de détection de certaines protéines nucléolaires

A. Immunofluorescences montrant la diminution de signal de la protéine UBF induite par une forte surexpression de GFP-HMG2L1 dans des cellules HeLa (flèches, panneaux du haut). En bas, la GFP seule n'induit aucune diminution de signal. B. Idem que A mais pour PARP-2.

Il est néanmoins important de souligner que cette localisation nucléolaire a été mise en évidence grâce à la surexpression de la protéine GFP-HMG2L1. Nous avons donc tenté de confirmer la présence de la protéine endogène dans le nucléole par diverses méthodes. Nous avons tout d'abord procédé à des immunofluorescences à l'aide de plusieurs anticorps commerciaux dirigés contre HMG2L1. Les anticorps révélaient une localisation nucléaire, mais pas nucléolaire. Toutefois, l'absence de diminution du signal détecté dans des cellules

transfectées avec un siARN ciblant HMG2L1 laisse planer le doute quant à la spécificité du signal observé par immunofluorescence avec ces anticorps.

Néanmoins, une expérience de *knock-in* menée par l'institut Weizmann nous a permis de conforter nos observations (<http://www.weizmann.ac.il/mcb/UriAlon/DynamProt/>). En effet, ils ont intégré la séquence de la YFP dans le génome de cellules H1299 par *knock-in* et il s'avère que HMG2L1 a été ciblée par le processus. Le gène reste régulé transcriptionnellement comme il l'était avant le *knock-in*. Les observations montrent que HMG2L1 a bien une localisation nucléaire et nucléolaire, comme c'est le cas avec la lignée stable décrite précédemment.

Afin de nous approcher des conditions de cette expérience, nous avons utilisé des vecteurs d'expression YFP avec deux promoteurs faibles (TK : promoteur de la thymidine kinase et mTK : promoteur minimal de la thymidine kinase) comparé au promoteur fort CMV des vecteurs d'expression pEGFP (**figure 34**). Les résultats montrent que GFP-HMG2L1 reste nucléaire et nucléolaire même lors d'une expression transitoire faible.

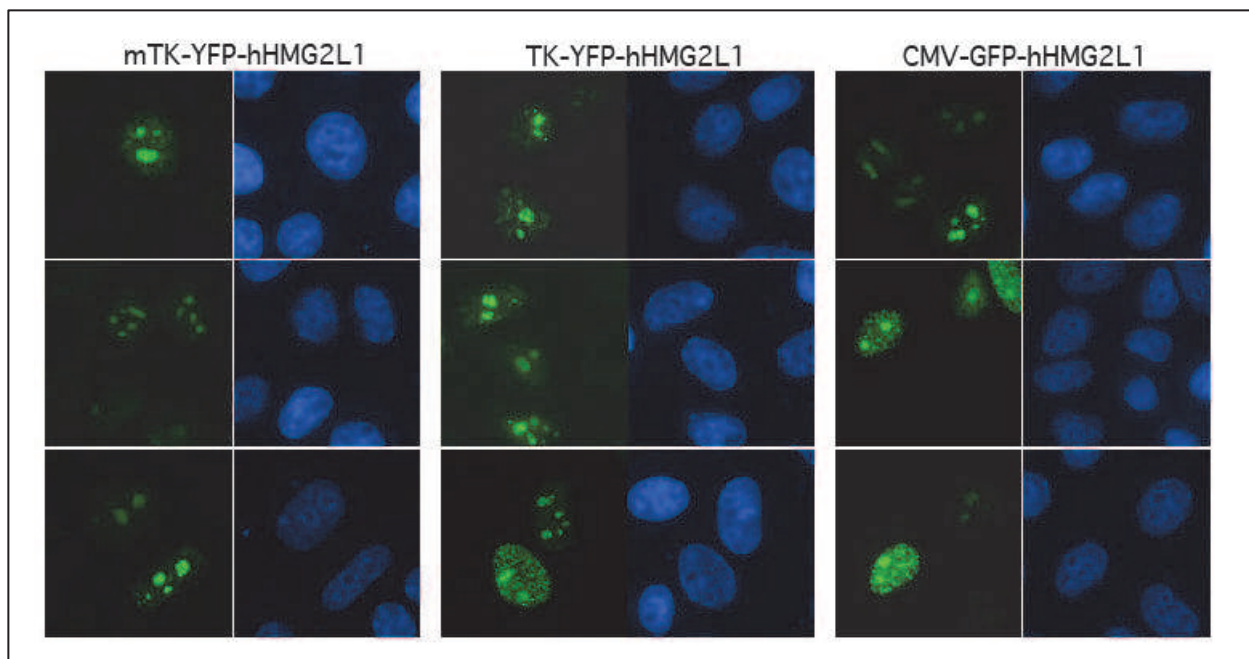


Figure 34 : HMG2L1 surexprimée modérément est nucléolaire

Immunofluorescences montrant la localisation nucléolaires des 3 constructions mTK-YFP-HMG2L1 (à gauche), TK-YFP-HMG2L1 (au milieu) et CMV-GFP-HMG2L1 (à droite). De gauche à droite, les promoteurs sont de plus en plus forts. TK : promoteur de la thymidine kinase ; mTK : promoteur minimal de la thymidine kinase.

Enfin, nous avons également eu recours à la purification de nucléoles à partir de cellules HeLa afin de démontrer la présence de HMG2L1 dans cet organite. Nous avons utilisé le marqueur UBF pour démontrer l'enrichissement de la protéine dans la fraction nucléolaire. Il s'avère que PARP-1 et HMG2L1 se retrouvent également dans cette fraction (**figure 35**). La présence d'UBF dans le nucléoplasme est attendue puisqu'une étude a montré qu'elle joue un rôle dans la voie Wnt (Grueneberg et al., 2003).

Enfin, une dernière expérience nous a encore permis de confirmer ce résultat : la recherche de partenaires de HMG2L1 par spectrométrie de masse.

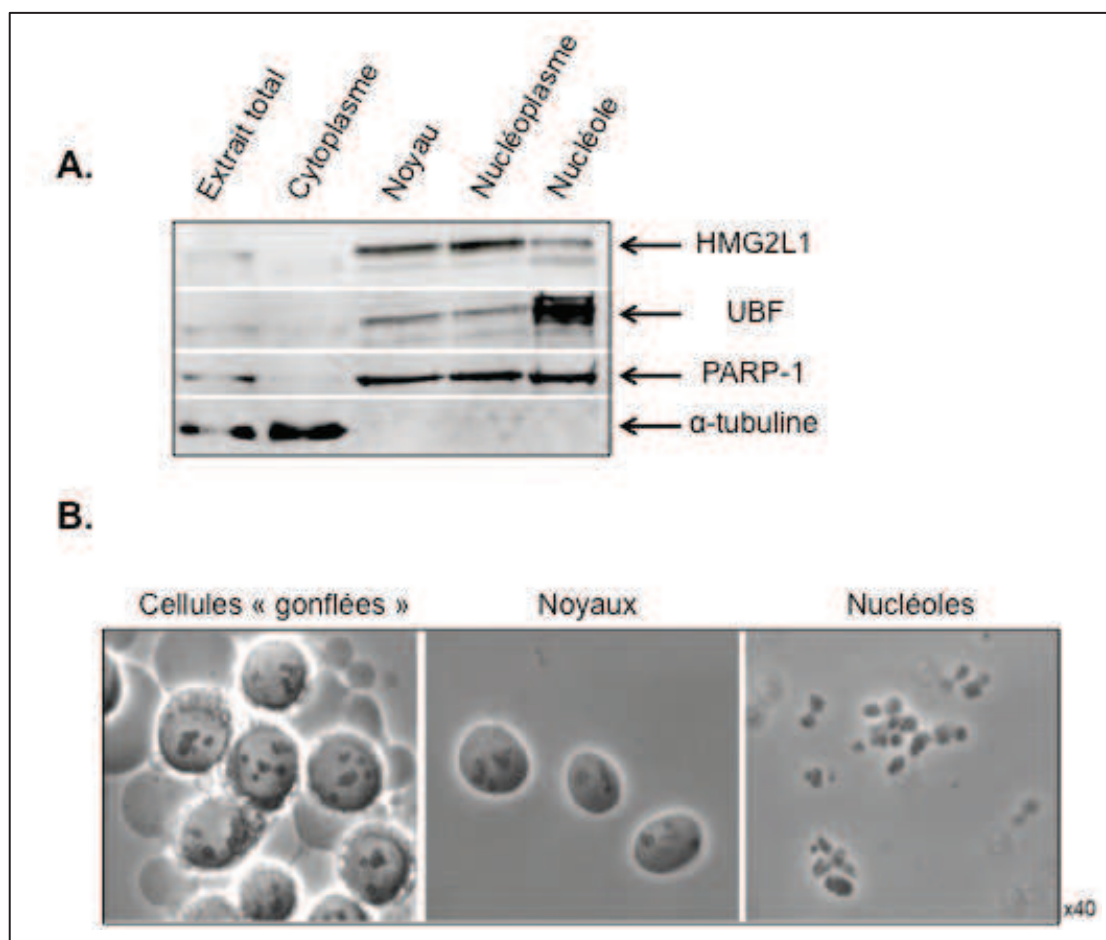


Figure 35 : HMG2L1 est une protéine nucléaire et nucléolaire

Figure montrant la présence de HMG2L1 dans le nucléole de cellules HeLa. Les cellules ont été récupérées et les nucléoles purifiés sur coussins de sucrose. A. Western-blot permettant d'observer la présence de HMG2L1 endogène dans la fraction nucléolaire comme PARP-1 et UBF (contrôle positif d'enrichissement). La protéine α -tubuline permet de vérifier qu'il n'y a pas de contamination cytoplasmique. B. Images de microscopie à contraste de phase permettant de vérifier chaque étape de purification. A gauche, les cellules gonflées par le choc osmotique, au milieu les noyaux purifiés et à droites les nucléoles isolés.

2.6. Recherche d'interactants de HMG2L1 par spectrométrie de masse

Dans le but d'aller plus loin dans la caractérisation de la protéine HMG2L1 et de mettre à jour de nouvelles fonctions la concernant, nous avons procédé à des études de protéomique. Pour cela nous avons exprimé la protéine GFP-HMG2L1 dans des cellules HEK-293T et procédé à une immunoprécipitation de la protéine à l'aide du système GFP-trap. Les échantillons ont été analysés par MudPIT (Multidimensional Protein Identification Technology) à Illkirch (Proteomic Facility, IGBMC, technique permettant l'analyse d'un échantillon protéique sans passer par l'étape de gel SDS-PAGE et de coupure de bandes) ou en micro-capillaire LC/MS/MS à Harvard (Taplin Biological Mass Spectrometry Facility, Harvard Medical School). Nous avons pu ainsi révéler un grand nombre de protéines nucléolaires : des protéines ribosomales et des protéines impliquées dans le métabolisme de l'ARN, c'est-à-dire des hélicases ou encore des ribonucléoprotéines (**publication 2, figures 5A, 5B et tableau supplémentaire**).

En revanche, il été fort surprenant de ne retrouver que quelques peptides de PARP-1 ou UBF, qui pourtant interagissent avec HMG2L1 comme nous l'avons montré précédemment par immunoprécipitation.

A partir de ces résultats nous avons pu échafauder plusieurs hypothèses : HMG2L1 pourrait être impliquée dans la biogenèse des ribosomes en intervenant soit sur la transcription des ADN_r soit sur la maturation des ARN_r et l'assemblage subséquent du ribosome. La protéomique nous apprend également que les interactions ne semblent pas être modulées par le PAR puisque le traitement des cellules avec un inhibiteur PARP n'induit pas d'importantes variations dans l'identité et le nombre de peptides obtenus. Nous avons tout de même voulu confirmer ce résultat par quelques immunoprécipitations.

2.7. Les interactions protéiques ne sont pas modulées par le PAR

Une fois que plusieurs interactants potentiels de HMG2L1 aient été déterminés par spectrométrie de masse, il était important d'en confirmer quelque uns. Pour cela, nous avons eu recours à une expérience d'immunoprécipitation, toujours à l'aide de la protéine fusion GFP-HMG2L1. Nous avons testé la co-immunoprécipitation des protéines nucléophosmine (ou B23) et fibrillarine qui sont nucléolaires et dont le nombre de peptides identiques était

important (**figure 36**). Le résultat de la protéomique a été confirmé, et une fois de plus, les interactions se font via le domaine N-terminal désordonné de HMG2L1, entérinant son rôle de plateforme d'interaction. En parallèle, nous avons montré que toutes ces interactions protéiques ne sont pas modulées par le PAR et que donc les fonctions potentielles de HMG2L1 en lien avec ces interactions ne sont vraisemblablement pas régulées par l'activité des PARPs (**publication 2, figure 5.C**).

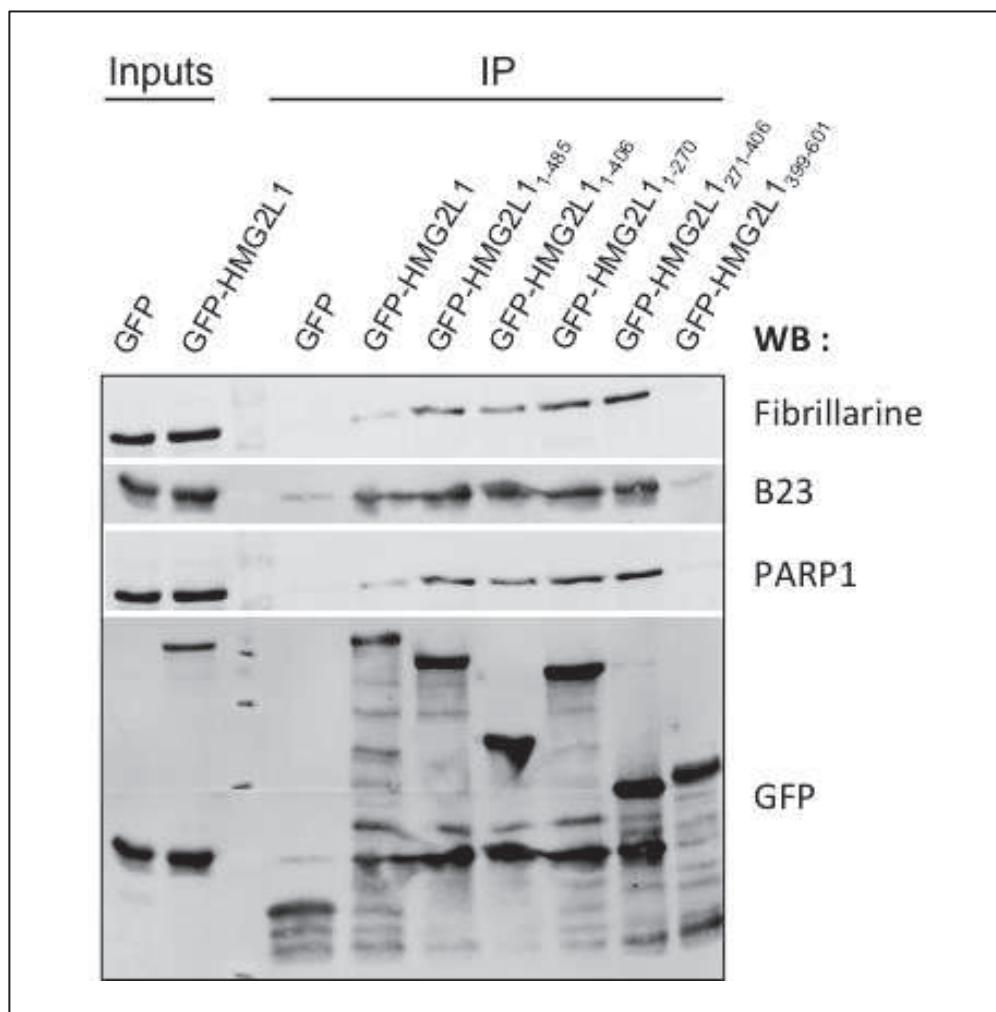


Figure 36 : Validation de la protéomique par immunoprécipitation

Immunoprécipitations permettant la validation la protéomique. Les formes tronquées de HMG2L1 en fusion avec la GFP ont été exprimées dans des cellules HEK293T et récupérées par immunoprécipitation à l'aide du GFP-trap. La co-immunoprécipitation de la fibrillarine et de B23 a été testée par western-blot. PARP-1 est utilisé en contrôle positif.

3. Discussion et perspectives

L'ensemble de nos résultats actuels montre que HMG2L1 est une nouvelle protéine nucléolaire localisée principalement dans le centre fibrillaire où elle colocalise fortement avec UBF, le facteur de transcription de l'ARN polymérase I. De plus, nous avons montré qu'un lien étroit existe entre HMG2L1 et PARP-1/PARP-2. En effet, ces protéines interagissent directement entre elles mais surtout les PARPs sont capables d'hétéromodifier HMG2L1. En outre, cette dernière est capable d'interagir avec le PAR libre produit par ces PARPs.

Nous avons tout au long de ce projet, fait face à des doutes concernant la localisation de la protéine endogène HMG2L1. En effet, seules les observations de l'institut Weizmann et nos expériences de fractionnement cellulaire permettent de dire que HMG2L1 peut s'accumuler dans le nucléole. A l'inverse, nous n'avons jamais réussi à le montrer par immunofluorescence malgré l'utilisation de 4 anticorps différents. Seul l'anticorps produit chez la souris de Sigma nous a permis de localiser la fusion HMG2L1-HA dans le nucléole de cellules transfectées, mais pas la protéine endogène. De même, plusieurs protéomiques décrites dans la littérature et qui ont été réalisées uniquement sur les fractions nucléolaires dans des conditions natives ou de stress n'ont permis de détecter HMG2L1 dans cet organelle (Andersen et al., 2002; Boisvert et al., 2006; Moore et al., 2011). Néanmoins, ces techniques ont leurs limites et beaucoup de protéines sont ainsi non détectées, c'est le cas de PARP-2 par exemple qui est pourtant bien nucléolaire (Meder et al., 2005). Enfin, une étude a montré récemment que l'histone H2B fusionnée à la GFP s'accumule transitoirement dans le nucléole avant de rejoindre progressivement sa localisation normale : la chromatine (Musinova et al., 2011). Les auteurs expliquent que l'accumulation nucléolaire est due à la présence d'un segment d'acides aminés basiques qui interagirait avec des facteurs électronégatifs du nucléole. La localisation est donc aspécifique, transitoire et causée par la surexpression de la protéine. Nous avons forcément fait le parallèle avec HMG2L1 qui est particulièrement basique. Toutefois, HMG2L1 contient bien des NoLS putatifs et demeure dans le nucléole même après plusieurs jours puisque la lignée stable exprimant GFP-HMG2L1- Δ Cter (1-486) est constamment accumulée dans le nucléole. De plus, en réduisant l'expression de la protéine de fusion en remplaçant le promoteur fort CMV par un promoteur très faible (mTK), nous observons encore une localisation nucléolaire.

La capacité de HMG2L1 à s'accumuler dans le nucléole est de fait réelle, cependant nous gardons à l'esprit que ce processus peut être finement régulé par la cellule. En effet, nous savons par exemple que la localisation de la protéine CTCF dans le nucléole est clairement contrôlée par la poly(ADP-ribosyl)ation et que sa présence dans cet organite inhibe la transcription (Torrano et al., 2006). Cette localisation est observée par exemple dans le cas de la différenciation cellulaire ou de l'induction de l'apoptose où CTCF induit alors l'inhibition de la transcription. En revanche, dans des cellules souches embryonnaires, elle favorise plutôt la formation d'une chromatine permissive à la transcription en interagissant avec UBF (Scott et al., 2011). Même si dans notre cas les PARPs et le PAR ne semblent pas contrôler la localisation de HMG2L1, nous devons garder à l'esprit cette théorie. En effet, nous savons que HMG2L1 est impliquée dans la régulation de la transcription mais plus précisément dans le processus de différenciation des muscles lisses et la voie Wnt (également liée aux processus de différenciation cellulaire). Nous pouvons alors imaginer une relocalisation nucléolaire de HMG2L1 à ces moments de la vie cellulaire, ce qui permettrait d'intervenir sur la biogenèse des ribosomes. Il serait alors intéressant de découvrir un tel mécanisme et d'étudier par quel processus la localisation subcellulaire de HMG2L1 est modulée.

II. Purification de HMG2L1

1. Introduction

Nous avons donc montré que HMG2L1 interagit avec PARP-1, PARP-2 et le PAR et qu'elle est poly(ADP-ribosyl)ée. En outre, nous avons pu la localiser dans le nucléole et la protéomique a permis de suggérer le cadre de sa fonction : la biogenèse des ribosomes et la maturation des ARN. Afin de continuer dans cette voie, nous avons voulu tester l'interaction de HMG2L1 avec l'ARN et l'ADN.

Afin de caractériser biochimiquement la protéine, nous avons donc décidé de la purifier à partir d'inductions dans *E. coli*. Pour cela, nous avons induit l'expression de la protéine à l'IPTG avant de lyser les cellules en vue de la purification. Comme nous l'avons vu dans la partie 1 des résultats, HMG2L1 est une protéine particulière dans le sens où elle est à plus de 50% prédite comme intrinsèquement désordonnée. Nous nous sommes donc heurtés à cette caractéristique dans le sens où nous n'avons jamais pu obtenir une protéine pure non dégradée, ces régions désordonnées étant fortement sensibles aux protéases.

Dans le but de purifier HMG2L1, nous avons mis en place un protocole qui prend en compte le caractère biochimique de la protéine : basique et interagissant certainement avec l'ADN via son domaine HMG (**figure 37**). La protéine HMG2L1 en fusion avec un tag histidine en N-terminal a été produite dans la bactérie et le lysat a été dans un premier temps déposé sur une colonne héparine. Ce composé appartenant à la famille des glycosaminoglucanes mime les acides nucléiques de par sa composition : des oses et des sulfates mimant les groupes phosphates. La protéine est éluée à l'aide d'un gradient de NaCl. Dans un second temps, nous avons purifié la protéine sur colonne HiTrap (GE Healthcare) interagissant avec le tag histidine. L'éluion est réalisée en présence d'imidazole. Cette seconde étape permet de concentrer la protéine car la colonne ne fait que 1 mL, néanmoins il faut la dialyser afin d'éliminer l'imidazole et de diminuer la concentration en sels.

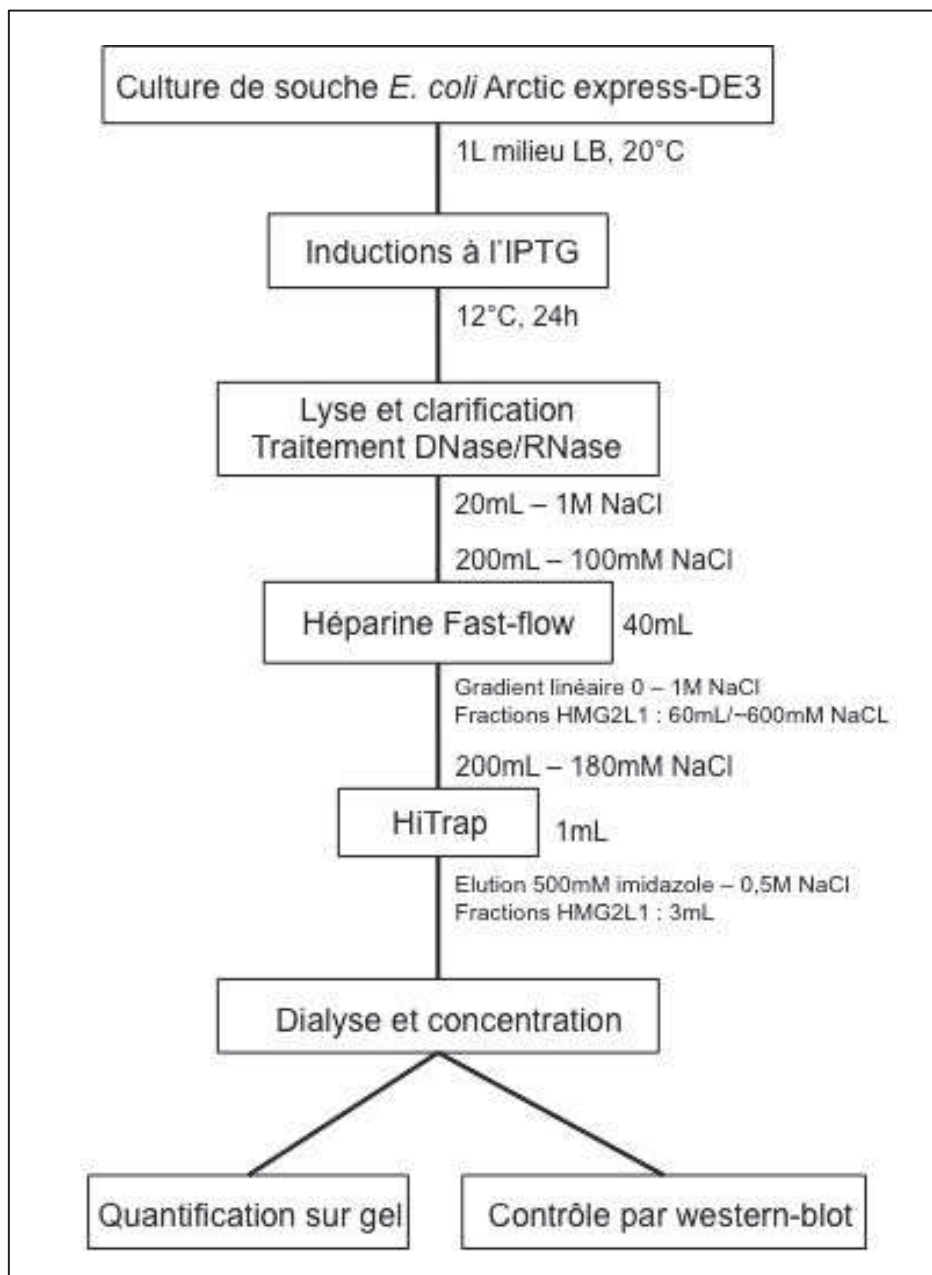


Figure 37 : protocole de purification de HMG2L1

Schéma représentant le protocole de purification suivi dans le cas de la purification de la protéine 6his-HMG2L1 produite dans *E. coli*. Du haut vers le bas, les différentes étapes ainsi que les volumes et concentrations en sels sont indiqués.

Nous avons volontairement choisi la souche d'*E. coli* Arctic express DE-3 car elle permet l'expression de la protéine induite à basse température (12°C) et parce qu'elle exprime des chaperones d'origine bactérienne fonctionnant à cette température. Ceci permet de favoriser au maximum la stabilité et la solubilité de la protéine, facteurs essentiels pour une protéine dont nous savons qu'elle est majoritairement désordonnée. La protéine est produite à 12°C pendant 24h en présence d'IPTG (IsoPropyl-β-D-1- ThioGalactopyranoside). Les bactéries sont ensuite récupérées puis lysées en présence de 1 M NaCl et 1% Triton X-100, et le lysat est traité à la DNase et la RNase afin d'éviter les acides nucléiques contaminants potentiellement liés à HMG2L1 à cause de ses particularités biochimiques.

2. Résultats

2.1. 1^{ère} étape : colonne d'héparine

Dans un premier temps, le lysat clarifié et dilué a été chargé sur la colonne héparine tandis que la purification est pilotée par ordinateur (Akta purifier). Les constantes suivantes sont mesurées : DO_{254nm} (acides nucléiques), DO_{280nm} (protéines), DO_{230nm} (liaisons peptidiques), la conductimétrie et la concentration en NaCl exprimée en % (**figure 38**). Après le chargement du lysat et le lavage de la colonne, l'élution a été réalisée à l'aide d'un gradient de NaCl en fractions de 10mL. Nous pouvons constater que la majorité des protéines sort au début à 200 mM NaCl. Viennent ensuite les protéines liées à l'héparine qui sortent sous forme de petits pics à 280nm. Enfin, le dernier pic à 230nm est assez étalé et sort tardivement aux alentours de 600 mM NaCl, ce qui signifie que ces fractions contiennent des protéines puissamment liées aux acides nucléiques. Différentes fractions ont été déposées sur gel SDS-PAGE afin de déterminer celles qui contiennent HMG2L1. Nous avons choisi la fraction 10 du pic majoritaire contenant les protéines non liées à la colonne, puis toutes les fractions de 17 à 28 qui devraient normalement contenir HMG2L1. Les gels ont été colorés au bleu de Coomassie et les images sont montrées en **figure 39**.

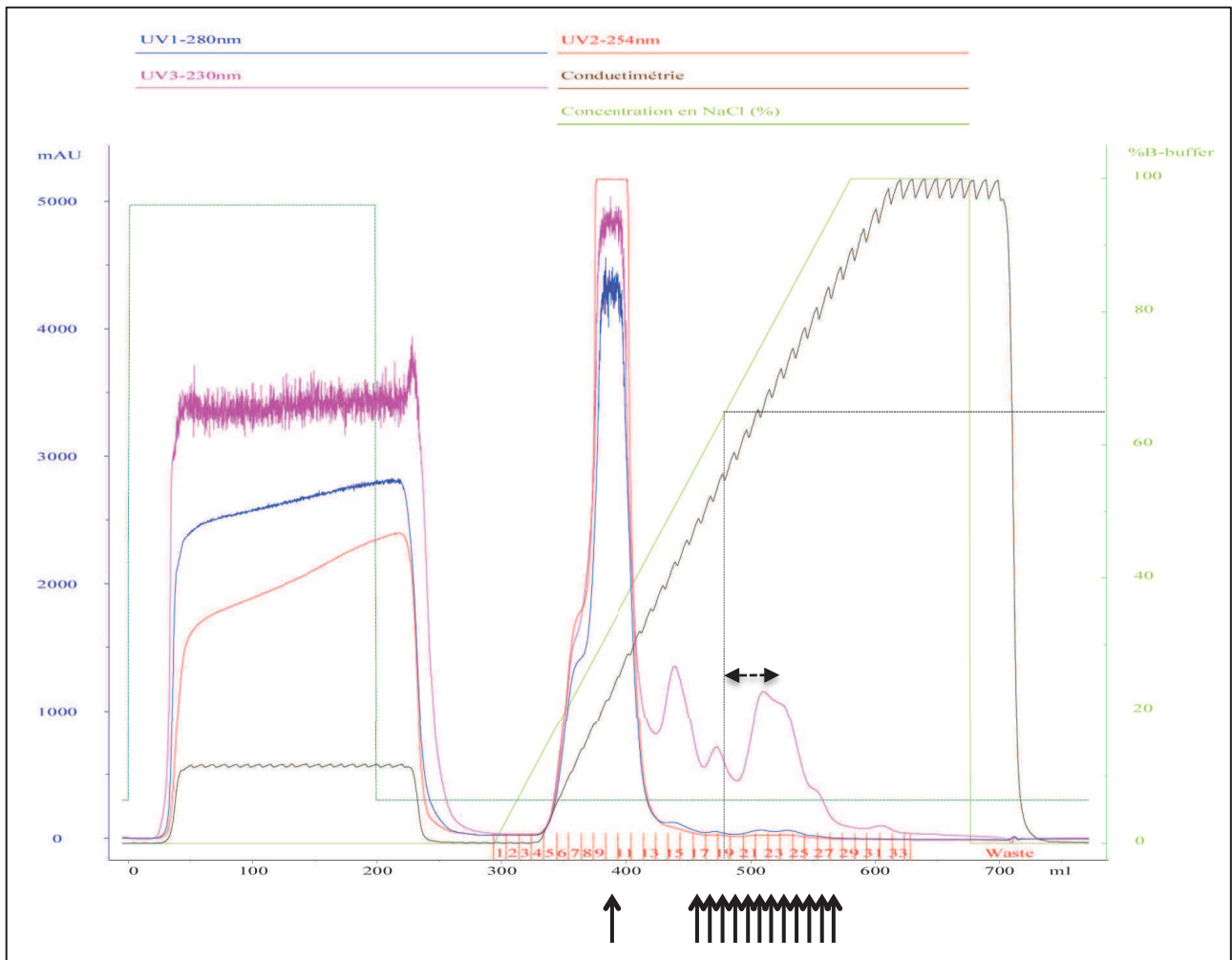


Figure 38 : Purification de 6his-HMG2L1 sur héparine

Profil d'élution de HMG2L1 sur colonne d'héparine. Les courbes de DO_{280nm} (protéines), DO_{230nm} (liaisons peptidiques), DO_{254nm} (acides nucléiques), conductimétrie et concentration en NaCl y sont représentées. Les pointillés noirs permettent de donner approximativement la concentration en NaCl d'élution de HMG2L1 (en tenant compte des 40 mL de volume de la colonne). Les flèches indiquent les fractions récupérées et déposées sur gel SDS-PAGE.

Les gels montrent que c'est HMG2L1 qui sort en dernier de la colonne à plus de 600 mM NaCl. Néanmoins, la protéine sort de manière étalée dans environ 7 fractions mais seules les 6 dernières (23-28) sont conservées pour la suite. En effet, la fraction 22 contient HMG2L1 mais également d'autres fragments ou protéines dans les faibles poids moléculaires. Nous verrons plus tard qu'il s'agit vraisemblablement de fragments protéiques dégradés de HMG2L1 dont nous voulions de toute manière nous débarrasser. Les 6 fractions sont donc mises en commun et diluées car leur concentration en NaCl excède les 600 mM (**figure 39**).

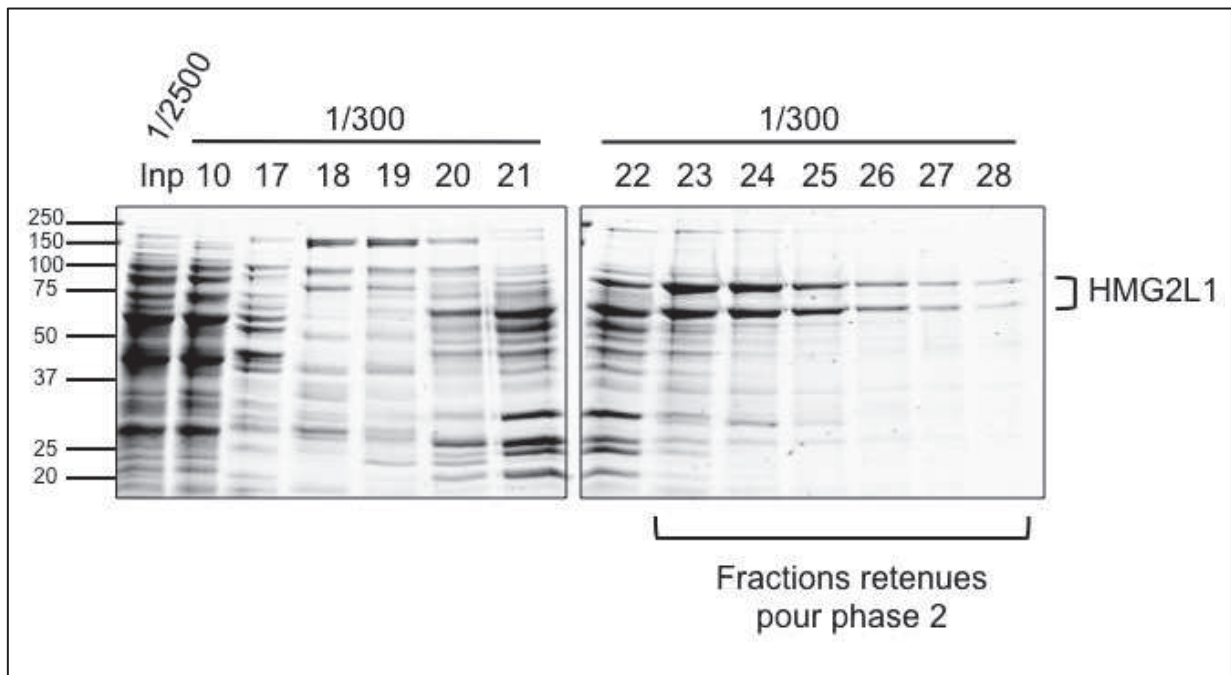


Figure 39 : les fractions à la sortie de l'héparine

Gel SDS-PAGE 10% coloré au bleu de Coomassie montrant les fractions à la sortie de la colonne d'héparine. L'échelle de poids moléculaire est indiquée à gauche, les deux bandes majoritaires de HMG2L1 à droite et les fractions retenues pour la phase 2 en bas.

2.2. 2^{ème} étape : colonne HiTrap

Les deux avantages de cette étape sont : l'HiTrap est une colonne d'affinité plus précise que l'héparine – qui retient toutes les protéines qui interagissent potentiellement avec les acides nucléiques – et elle permet de concentrer la protéine du fait de son petit volume de 1 mL. Après dilution des fractions provenant de l'héparine, la concentration en sels retombe à 200 mM, ce qui est acceptable avant de déposer la protéine sur la colonne HiTrap spécialement conçue pour lier les tags histidine. Après le dépôt et les lavages en présence de 30 mM imidazole, l'élution en fractions de 1 mL est réalisée à l'aide de 500 mM imidazole. Cette étape n'est pas réalisée sur l'*Aktä purifier* et nous n'avons donc pas de graphique des DO disponible. Néanmoins, nous avons déposé chaque fraction sur gel SDS-PAGE et montré que la purification a fonctionné (**figure 40**). En revanche, la piste 3 de la purification montre que la protéine est présente sous la forme de 3 fragments majoritaires : la pleine longueur et 2 formes dégradées. Ces formes sont présentes au milieu d'autres fragments minoritaires

correspondant soit à des protéines contaminantes soit à des formes dégradées de HMG2L1. Nous avons donc voulu vérifier la qualité de la purification par Western-blot.

2.3. Vérification de la purification

Nous avons tout d'abord dialysé, concentré et quantifié la protéine avant de vérifier par western-blot la qualité de la purification. Nous avons pour cela eu recours à plusieurs anticorps ciblant plusieurs régions de HMG2L1 (1-601). Le premier d'origine murine cible les 75 premiers acides aminés, le deuxième provenant de la chèvre reconnaît une séquence interne et le troisième a été produit chez le lapin envers le domaine HMG/C-terminal (409-587). Les résultats sont donnés en **figure 41**.

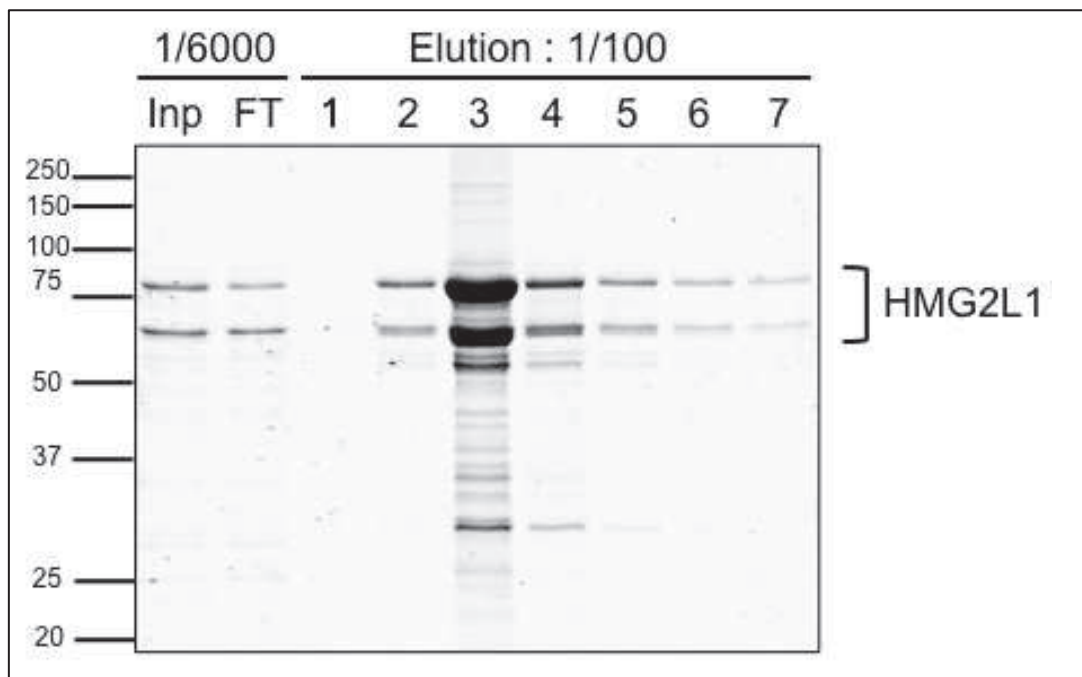


Figure 40 : les fractions à la sortie de l'Hitrap

Gel SDS-PAGE 10% coloré au bleu de Coomassie montrant les fractions à la sortie de la colonne HiTrap. L'échelle de poids moléculaire est indiquée à gauche et les deux bandes majoritaires de HMG2L1 à droite.

Ces trois anticorps n'ont bien sûr pas la même efficacité, néanmoins ils reconnaissent au moins la forme complète de la protéine et une des deux formes majoritaires dégradées en dessous de 75 kDa. En fait, les anticorps de chèvre et de lapin reconnaissent la forme dégradée du haut, tandis que l'anticorps murin cible celle du bas. Nous pourrions donc imaginer un site de clivage majeur situé vers le milieu de la protéine, libérant ainsi la partie N-terminale reconnue par l'anticorps murin et la partie C-terminale ciblée par les deux autres anticorps.

L'anticorps produit dans la souris et ciblant les 75 premiers acides aminés donne le meilleur résultat et permet de constater que la majorité des bandes observées à la fin de la purification correspond bien à des formes dégradées de HMG2L1. L'échelle de fragments observée est par ailleurs impressionnante et permet de constater la fragilité de HMG2L1.

Nous avons tenté plusieurs approches complémentaires qui auraient pu permettre de discriminer ces bandes de dégradations de la protéine complète qui seule nous intéresse. En partant du postulat que la protéine, et surtout le domaine N-terminal désordonné, a tendance à s'agréger, nous avons voulu tester la purification en présence d'urée 5 M, ce qui devait permettre de séparer les différents fragments agrégés pour améliorer leur discrimination sur la colonne d'héparine. Cet essai n'a cependant pas permis d'améliorer le profil de fractionnement et tous les fragments sont élués au même moment.

De même, une électro-élution de la bande de plus haut poids moléculaire correspondant à la protéine pleine longueur a conduit à l'obtention d'une protéine à nouveau dégradée, confirmant la fragilité de HMG2L1.

Nous avons donc décidé de travailler avec cette protéine issue de la colonne HiTrap, même si elle est partiellement dégradée. Nous avons vu depuis que la protéine recombinante commercialisée par certaines entreprises montre le même état de dégradation. Des expériences de retard sur gel ou de poly(ADP-ribosyl)ation *in vitro* sont tout de même possible même si bien évidemment ce n'est pas optimal quantitatives.

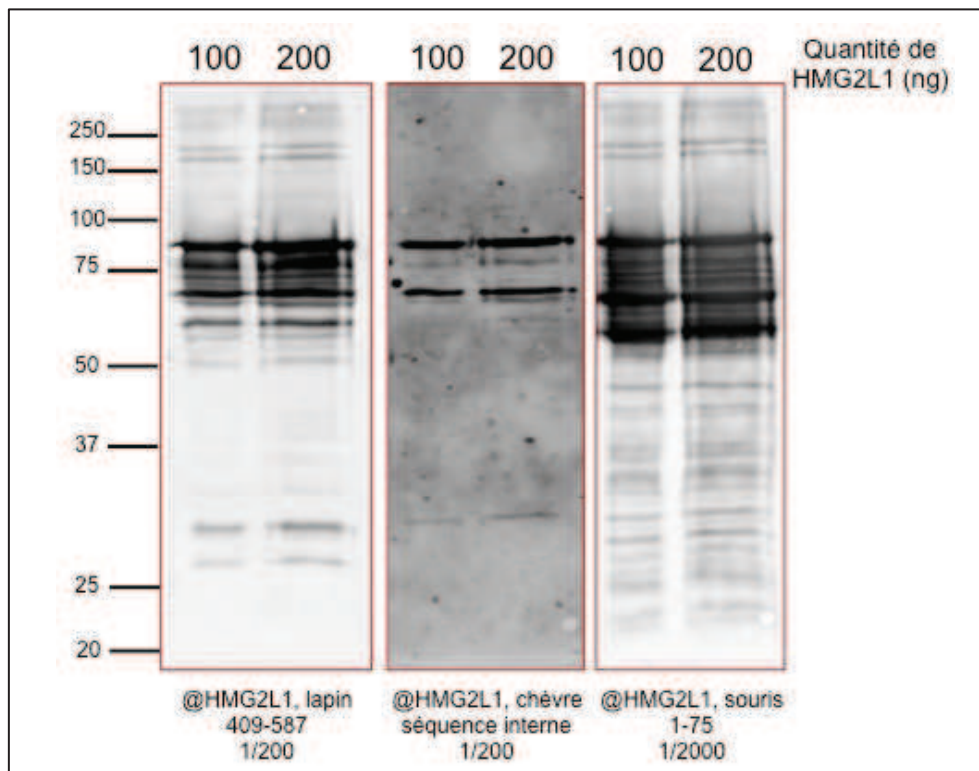


Figure 41 : vérification de la protéine purifiée par western-blot

Western-blots permettant de montrer la qualité de la protéine HMG2L1 purifiée et dialysée. Après quantification, 100 ou 200 ng de HMG2L1 ont été déposés gel SDS-PAGE 10%. Trois anticorps commerciaux dirigés contre la protéine ont alors été utilisés dans les concentrations indiquées. Est indiquée également la région de HMG2L1 contre laquelle est dirigé l'anticorps.

3. Discussion et perspectives

La purification de HMG2L1 était un volet important du projet qui a nécessité beaucoup de temps et d'effort pour essayer de s'affranchir de ces nombreuses formes dégradées. Nous avons tout de même une protéine avec laquelle nous pouvons réaliser des expériences *in vitro* basiques pour vérifier sa liaison à l'ADN ou l'ARN. Il serait néanmoins intéressant de tester la purification de la protéine à partir d'expressions dans des cellules eucaryotes (baculovirus par exemple), ce qui nous permettrait peut-être d'améliorer la qualité de la protéine obtenue.

Ce qui permettrait certainement d'améliorer la qualité de la purification ou de réduire la sensibilité de la protéine à la dégradation serait de trouver un interactant fort de la protéine, qui conférerait alors une structure plutôt stable à la protéine (Tompa, 2012). C'est une technique qui permet aussi la cristallisation de protéines peu structurées dans le but d'obtenir la structure tridimensionnelle des protéines. Il serait en effet intéressant de déterminer la structure de HMG2L1 et surtout du domaine C-terminal très conservé. Pour ce faire, il suffirait de le purifier seul et de résoudre sa structure par RMN par exemple. Cependant, le but ultime serait de cristalliser la protéine complète en compagnie d'un de ses principaux interactants, ce qui permettrait alors de comprendre comment fonctionnent les 3 segments indépendants : le domaine N-terminal, le domaine HMG et le domaine C-terminal.

III. HMG2L1 lie les acides nucléiques

1. Introduction

Comme nous l'avons vu précédemment, HMG2L1 est une protéine à domaine HMG qui contient en outre un large domaine N-terminal basique et intrinsèquement désordonné. De plus, les données de la littérature montrent qu'elle serait principalement impliquée dans la régulation transcriptionnelle en tant que cofacteur de transcription. Tout ceci implique une vraisemblable interaction de HMG2L1 à l'ADN voire à l'ARN. Nous avons pour cela voulu tester cette éventualité et la protéine HMG2L1 purifiée au laboratoire (voir partie II. Purification de HMG2L1) est un outil indispensable. Nous avons également eu recours aux formes tronquées de HMG2L1 en fusion avec la GFP afin de déterminer précisément les domaines impliqués. Enfin, nous avons procédé à plusieurs types d'expériences qui nous ont permis de confirmer ou de préciser les résultats obtenus. Nous allons dans un premier temps nous intéresser à la liaison à l'ADN avant de discuter l'interaction à l'ARN.

2. Résultats

2.1. HMG2L1 lie l'ADN de manière séquence-indépendante

Pour tester l'interaction de HMG2L1 avec l'ADN, nous avons dans un premier temps dû choisir la séquence et la structure de l'ADN afin de procéder à des expériences de retard sur gel. Ne voulant pas choisir une séquence d'un ADN caractérisé – comme une séquence d'ADNr par exemple – pour ne pas biaiser le résultat, nous avons privilégié la synthèse d'un ADN dont nous avons choisi la séquence et la structure couplé à un fluorophore excité dans l'infrarouge. Il est structuré en double-brin avec à chaque extrémité un bulge et au centre une structure dite flap retrouvé par exemple dans le cas du processus de réparation des cassures simple-brin dans l'ADN : une cassure simple-brin avec une extension d'un brin formant donc un ADN simple-brin. Il a donc l'avantage de contenir 4 types de structures différentes qui peuvent potentiellement interagir avec HMG2L1. Cet ADN, appelé flap5', a notamment été utilisé lors de l'étude de l'interaction de PARP-2 avec l'ADN (Kutuzov et al., 2013).

Dans un deuxième temps, nous avons à définir les expériences à mener pour répondre à notre problématique. Nous avons tout d'abord procédé à des Southwestern-blots afin de déterminer rapidement si l'interaction était possible. Cette expérience consiste à séparer la protéine purifiée sur gel SDS-PAGE, de transférer sur membrane de nitrocellulose, de renaturer les protéines et de l'incuber avec l'ADN marqué. En parallèle de l'ADN-flap, nous avons testé d'autres structures comme un ADN simple-brin (J3), un ADN arborant une extension simple-brin (J3J1) et un ADN double-brin avec une coupure simple-brin en son milieu (J3J2J1) (voir **tableaux 2 et 3**).

Nom	Séquence
Flap 5'	5'-Alexa680-TGT-TCT-CCA-GGA-AGT-TCG-TTT-TCG-AAC-TTC-CGC-GAA-GCT-TCT-GCC-TTT-TGG-CAG-AAG-CTT-CGC-3'
J3	5'-Alexa680-AAG-GGC-AAG-GCT-GCT-GTG-GAC-CCT-GCT-GTG-GGC-TGG-AGA-ACA-AGG-TGA-TCT-GCG-CCC-TGG- TCC-TGG-3'
J1	5'-CCA-GGA-CCA-GGG-CGC-AGA-TCA-CCT-TGT-TCT-CCA-3'
J2	5'-GCC-CAC-AGC-AGG-GTC-CAC-AGC-AGC-CTTGCC-CTT-3'
ARN	5'-Alexa680-UGU-UCU-CCA-GGA-AGU-UCG-UUU-UCG-AAC-UUC-CGC-GAA-GCU-UCU-GCC-UUU-U-3'

Tableau 2 : séquences des ADN et de l'ARN utilisés






Nom de la structure	Structure
Flap-5'	
J3	
J3J1	
J3J2J1	
ARN	

Tableau 3 : structures des ADN et de l'ARN utilisés

Les données nous ont confirmé une interaction entre HMG2L1 et l'ADN puisque toutes ces structures ont donné un résultat positif (**publication 2, figure 6.A**). Néanmoins, nous avons noté des différences notables entre ces molécules. Premièrement, l'ADN-flap semble lier le plus fortement la protéine, viennent ensuite le nick, le 3'overhang puis le simple-brin. Il apparaît donc que HMG2L1 lie préférentiellement les structures double-brin. Nos contrôles positifs, PARP-1 et PARP-2 interagissent préférentiellement avec les structures contenant une cassure simple-brin comme l'ADN-flap5' ou l'ADN J3J2J1, conformément aux données de la littérature (D'Silva et al., 1999; Kutuzov et al., 2013; Lonskaya et al., 2005). En revanche, les contrôles négatifs BSA et PARP-1.40k (correspondant au domaine catalytique isolé) ne reconnaissent aucun ADN, comme attendu.

Dans le but de confirmer ce premier résultat, nous avons eu recours à deux autres types d'expériences : le retard sur gel et l'anisotropie de fluorescence, pour lesquelles nous n'avons travaillé qu'avec l'ADN-flap5' puisqu'il donnait l'interaction la plus forte. Ces approches nous ont permis d'entériner le fait que HMG2L1 interagit avec l'ADN (**publication 2, figure 6.B et 6.D**). Toutefois, en ce qui concerne le retard sur gel, nous n'avons pas pu obtenir de bande définie mais plutôt un « smear » correspondant vraisemblablement aux multiples fragments de HMG2L1 interagissant chacun avec l'ADN, donnant lieu ainsi à des migrations variées des complexes formés.

Dans un troisième temps, nous voulions déterminer le domaine de HMG2L1 impliqué dans l'interaction avec l'ADN. Pour cela, nous avons exprimé les fusions GFP dans des cellules eucaryotes puis procédé à leur immunoprécipitation à l'aide du GFP-trap. Les tests de liaison en solution avec l'ADN-flap5' ont montré que HMG2L1 lie l'ADN via son domaine HMG et, dans une moindre mesure, son domaine N-terminal basique et désordonné (**publication 2, figure 6.C**).

En conclusion, HMG2L1 interagit avec l'ADN via son domaine HMG comme les données de la littérature le laissaient présager. Même si le domaine N-terminal basique semble également contribuer à cette liaison, nous pouvons émettre l'hypothèse que cela pourrait être dû à ses propriétés électrochimiques plutôt qu'à une spécificité envers les acides nucléiques comme ce serait le cas pour un domaine protéique clairement défini.

N'ayant pas pu déterminer une fonction précise de HMG2L1 dans la régulation de la transcription des ADN_r par exemple, nous n'avons pas pu tester l'interaction de HMG2L1

avec les séquences promotrices de ces gènes. Nous avons cependant montré l'interaction de HMG2L1 avec l'ADN, même de séquence aléatoire, prouvant ainsi qu'elle peut reconnaître les ADN de manière séquence- et structure-indépendante.

2.2. Le PAR entrave la liaison de HMG2L1 avec l'ADN

Nous avons montré précédemment que HMG2L1 est potentiellement régulée doublement par le PAR. En effet, elle est modifiée par PARP-1 et PARP-2 mais elle est également capable de lier le polymère libre. Fort logiquement, nous avons donc voulu vérifier si la liaison au PAR pouvait entraver l'interaction entre HMG2L1 et l'ADN. Nous avons ainsi procédé à des expériences de retard sur gel en présence de concentrations croissantes en PAR. Les données nous montrent que le PAR entre bien en compétition avec l'ADN, et le « smear-shift » observé en l'absence de PAR disparaît au profit d'une bande unique correspondant à l'ADN libre, et ce proportionnellement à la quantité de PAR ajoutée (**publication 2, figure 6.E**).

Toutefois, nous pouvons nous demander comment le PAR qui lie la protéine en N-terminal est capable d'entraver la liaison à l'ADN, alors que celle-ci a lieu au niveau du domaine HMG de HMG2L1. Il semblerait donc que le PAR soit capable d'agir en structurant ce domaine N-terminal désordonné, conduisant certainement le domaine HMG à ne plus pouvoir lier l'ADN, à moins que ce ne soit lié à un simple phénomène de répulsion électrostatique. Si nous n'avons pas pu extrapoler cette donnée biochimique à une quelconque fonction cellulaire de HMG2L1, nos résultats mettent en avant une interaction fonctionnelle entre PARP-1 et HMG2L1, puisque le PAR peut réguler la liaison de HMG2L1 avec l'ADN.

2.3. HMG2L1 lie l'ARN de manière séquence-indépendante

Nous avons pu montrer à l'aide de nos données provenant de la protéomique que HMG2L1 était vraisemblablement fortement liée au métabolisme de l'ARN. En effet, nous avons ciblé de multiples protéines interagissant avec l'ARN et qui sont liées à son métabolisme. Nous pouvons ainsi citer des hélicases, des protéines modifiant les ARN ou encore des protéines impliquées dans leur épissage.

Logiquement, nous avons alors voulu tester l'interaction de HMG2L1 avec l'ARN. Ne voulant prendre aucun risque en choisissant un ARN caractérisé (comme par exemple une séquence d'ARNr), nous avons déterminé une séquence d'ARN basée sur l'ADN-flap5' avec le même fluorophore en extrémité 3'. Nous avons tout d'abord démontré l'interaction de HMG2L1 avec cet ARN par northwestern-blot, puis montré que c'est le domaine N-terminal de HMG2L1 (1-406) qui interagit préférentiellement avec l'ARN à l'aide d'expériences de liaisons en solution réalisées avec les fusions GFP (**publication 2, figures 7.A et 7.B**).

Dans un deuxième temps, nous avons voulu confirmer cette interaction par des expériences de retard sur gel, cependant ces dernières nous ont emmené sur une autre voie dont nous reparlerons en chapitre IV : HMG2L1 posséderait une activité ARN chaperonne. Néanmoins, les expériences de retard sur gel montrent une interaction car un « smear » apparaît, de même que les poches du gel contiennent encore des complexes certainement trop volumineux pour entrer dans le gel (**publication 2, figures 7.C et 7.D**).

Aucun domaine de liaison à l'ARN n'a été clairement détecté dans HMG2L1, nous pouvons donc émettre l'hypothèse que les interactions se font principalement par le biais de liaisons électrostatiques. De plus, ce domaine étant largement désordonné, nous pouvons facilement concevoir qu'il puisse s'adapter à n'importe quelle séquence ou structure d'ARN, comme nous l'avons démontré avec cet ARN choisi au hasard.

2.4. Le PAR entrave la liaison avec l'ARN

Comme le PAR module la liaison de HMG2L1 avec l'ADN, nous avons posé la question concernant l'ARN. Nous avons donc procédé à un retard sur gel avec des concentrations croissantes de PAR, et observé que l'interaction est entravée par le polymère puisque les complexes disparaissent des puits et les « smears » s'estompent (**publication 2, figure 7.E**). Comme le PAR interagit avec le même domaine N-terminal de HMG2L1, nous pouvons émettre l'hypothèse que nous avons certainement à faire à une compétition électrostatique pour les mêmes sites.

Comme pour l'ADN, nous n'avons pas pu montrer que la modulation de la liaison de HMG2L1 à l'ARN par le PAR est également de mise *in vivo*. D'ailleurs, il nous fallait une concentration en PAR de 10 à 100 fois supérieure à celle d'ARN pour diminuer l'interaction

entre ce dernier et HMG2L1 *in vitro*. Cela signifie qu'il faudrait probablement une forte concentration locale en PAR dans la cellule afin de parvenir à moduler finement l'interaction de HMG2L1 avec l'ARN. Les données de la littérature montrent que l'activation des PARPs est généralement locale, comme c'est le cas dans la réparation des cassures dans l'ADN (site de la cassure) ou dans la régulation de la transcription (promoteur), nous pouvons donc imaginer tel mécanisme dans la régulation de HMG2L1.

3. Discussion et perspectives

Nous avons donc dans cette partie de projet réussi à démontrer que HMG2L1 est capable de lier l'ADN et l'ARN et que ces interactions peuvent être modulées par le PAR. Ces résultats pouvaient paraître évidents étant donné les caractères biochimiques du domaine N-terminal de la protéine et la présence d'un domaine HMG. Ils sont d'autant plus intéressants qu'ils ont été obtenus avec des séquences nucléotidiques que nous avons voulues indépendantes de tout processus cellulaire. Le résultat n'est donc pas biaisé par le choix arbitraire d'une séquence d'un gène d'ADNr ou d'ARNr comme nous aurions pu être tentés de le faire. Nous avons ainsi démontré que les domaines HMG et N-terminal lient respectivement l'ADN et l'ARN de manière séquence indépendante.

Néanmoins, comme nous n'avons pu mettre à jour de fonctions pour HMG2L1 dans le nucléole, nous ne pouvons pas vérifier *in vivo* les propriétés découvertes plus haut. Afin de déterminer les séquences génomiques sur lesquelles se lie HMG2L1, nous pourrions mener une immunoprécipitation de chromatine suivie d'un séquençage en masse des fragments obtenus. Par la suite, il serait alors important de vérifier les résultats observés en conduisant des expériences de retard sur gel avec la protéine purifiée.

Concernant l'ARN, nous avons mis à jour une nouvelle fonction de HMG2L1 qui est décrite dans le chapitre suivant : elle possède une activité chaperonne à ARN.

IV. HMG2L1 : une chaperonne à ARN ?

1. Introduction

Si nous n'avons pas réussi à caractériser une fonction cellulaire de HMG2L1 dépendante de PARP-1, nous avons tout de même pu mettre à jour une fonction primordiale de la protéine. En effet, nous avons pu montrer qu'elle possède une activité ARN chaperonne *in vitro*. Cette activité consiste à assister l'établissement de la structure tridimensionnelle fonctionnelle d'un ARN sans utilisation d'ATP (**figure 42**). En effet, l'ARN est une macromolécule qui peine à prendre sa structure finale fonctionnelle car les liaisons possibles entre bases sont multiples et les duplex sont facilement formés, donnant alors lieu à une structure secondaire ou tertiaire pouvant être thermodynamiquement aussi stable que la structure fonctionnelle. Ces structures sont appelées pièges cinétiques, car elles sont tellement stables qu'elles entravent la recherche de la bonne structure. Les études montrent d'ailleurs que c'est exactement ce qui se passe pour un ARN *in vitro*, tandis que la structure fonctionnelle est toujours établie *in vivo*, sauf quand la traduction protéique est inhibée (Rajkowitsch et al., 2007; Semrad and Schroeder, 1998). Semrad et Schroeder ont en effet montré que l'épissage de l'ARNm de la T4 thymidylate synthase est entravé en l'absence d'un ribosome fonctionnel car l'ARN est mal replié, cette étape nécessitant l'action de chaperonnes à ARN.

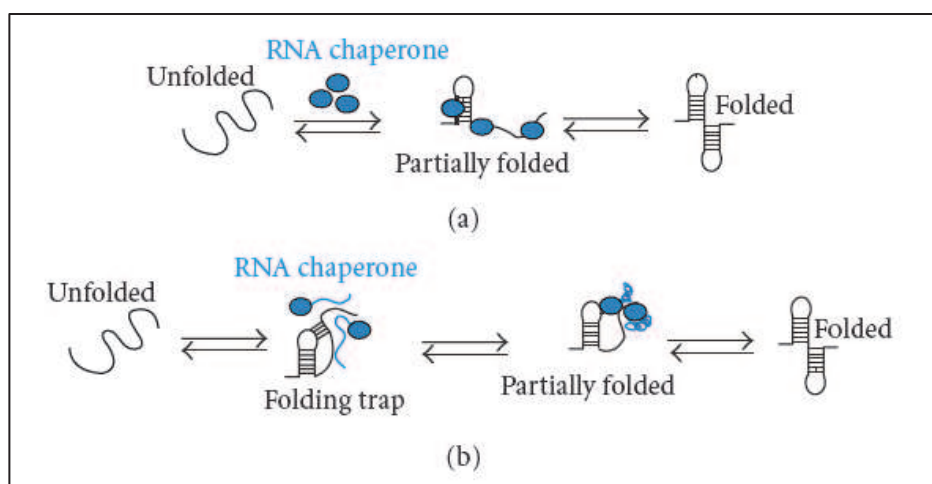


Figure 42 : Les mécanismes potentiels des chaperonnes à ARN

Les chaperonnes à ARN (bleu) aideraient au repliement correct d'un ARN en l'empêchant de prendre une structure incorrecte (a) ou permettraient à l'ARN de passer à travers un piège cinétique (b) afin de prendre le bon repliement. D'après (Semrad, 2011).

Le repliement d'un ARN dans sa structure tridimensionnelle fonctionnelle nécessite donc l'appui de protéines dites chaperonnes afin de passer les pièges cinétiques. Ces protéines peuvent en général assurer l'une ou l'autre de ces activités : le déplacement de brins ou l'appariement de brins (Semrad, 2011). Le déplacement de brin est une activité semblable à celle catalysée par les hélicases sauf qu'elle est réalisée sans apport d'énergie extérieure comme l'ATP. Il a été montré que les chaperonnes à ARN sont des protéines majoritairement composées de larges segments désordonnés et basiques qui permettraient d'accommoder l'ARN sur plusieurs sites et favoriseraient ainsi leur rapprochement spatial pour guider le repliement (Tompa and Csermely, 2004). L'intérêt du désordre structural est d'élargir le spectre d'action de ces chaperonnes puisque toute spécificité séquentielle et structurale est écartée. Cette description correspond tout à fait au domaine N-terminal (1-406) de HMG2L1, ce qui justifie les résultats que nous avons obtenus et qui sont décrits ci-après.

2. Résultats

2.1. HMG2L1 exerce une activité ARN chaperonne

Comme nous l'avons vu dans la partie III.3, HMG2L1 est capable d'interagir avec les ARN vraisemblablement de manière séquence-indépendante. En parallèle de l'interaction, les expériences de retard sur gel nous avons permis de mettre en évidence une activité ARN-chaperonne (**publication 2, figure 7.D**). En effet, nous avons observé que l'ARN est présent sous deux formes (I et II) dans le gel d'agarose. Or, l'ajout de HMG2L1 favorise clairement la structure II migrant moins vite en accélérant le processus thermodynamique de recherche de la forme native. Nous observons que la structure favorisée par HMG2L1 apparaît tout de même en l'absence de protéine mais après un long temps d'incubation. Dans l'expérience réalisée à 4°C, nous pouvons observer que la structure II commence à apparaître après 1 heure d'incubation alors qu'en présence de HMG2L1 elle est déjà à moitié convertie. De la même manière, à température ambiante HMG2L1 a converti tout l'ARN dans la structure II, tandis qu'en l'absence de la protéine les deux formes sont encore présentes en quantités quasiment identiques. Cela signifie clairement que HMG2L1 accélère un processus qui a lieu naturellement *in vitro*.

Comme le PAR entrave la liaison entre HMG2L1 et l'ARN, nous avons également voulu déterminer si le polymère était capable d'inhiber la fonction ARN chaperonne portée par HMG2L1. Nous avons alors procédé à des expériences de retard sur gel mais avec des concentrations croissantes de PAR. La structure II était perdue au profit de la structure I, et ce proportionnellement à la concentration de PAR ajoutée (**publication 2, figure 7.E**).

Nous avons alors cherché à modéliser les 2 structures d'ARN et pour cela nous avons utilisé le logiciel RNAfold (<http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAfold.cgi>). Ce dernier prédit au monomère une énergie libre de -15 kcal/mol. Si nous considérons que la structure II est un dimère, le logiciel prédit cette fois-ci une énergie libre de -43 kcal/mol soit environ 3 fois plus stable que le monomère (**figure 43**). Cette différence explique que le dimère soit favorisée, même si le temps nécessaire à sa formation est long en l'absence de HMG2L1. Ceci peut être dû à la présence de structures secondaires dans le monomère qui empêchent l'appariement avec une deuxième molécule d'ARN et qui représentent donc des pièges cinétiques.

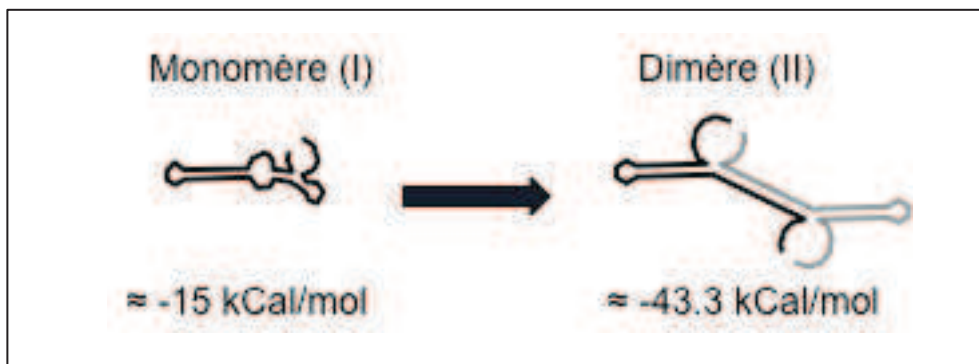


Figure 43 : structures I et II prises par l'ARN

Schéma montrant les structures prises par l'ARN en monomère ou en dimère. Les structures et les énergies libres ont été prédites par le logiciel RNA fold.

2.2. HMG2L1 favoriserait l'appariement de brins

Les expériences précédentes nous ont donc permis de montrer que HMG2L1 possède une activité ARN chaperonne. Afin de déterminer si elle est capable de déplacer des brins ou plutôt de favoriser leur appariement, des expériences préliminaires ont été réalisées en collaboration avec l'équipe d'Yves Mély (Université de Strasbourg, faculté de pharmacie, UMR7213, Illkirch, France). Ces expériences sont réalisées comme décrits dans la **figure 44** et font aujourd'hui consensus dans la littérature (Rajkowitsch and Schroeder, 2007).

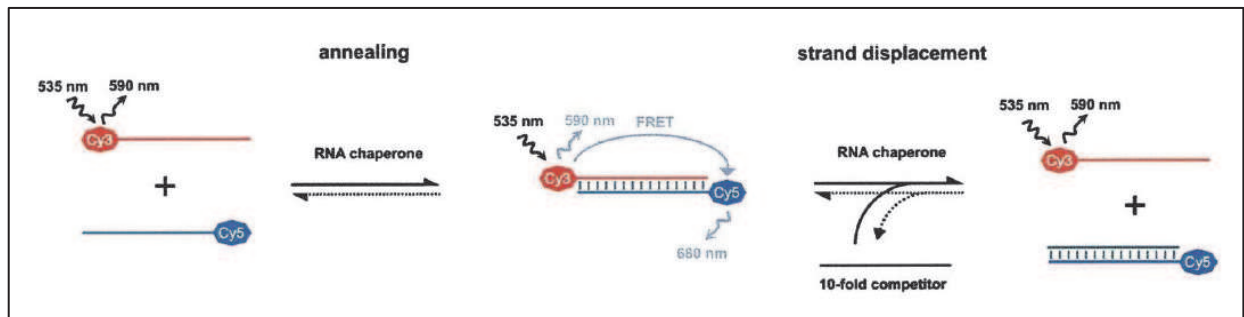


Figure 44 : le test d'activité chaperonne ARN *in vitro*

Illustration représentant le test *in vitro* utilisé pour confirmer une activité chaperonne à ARN. L'appariement de deux ARN de 21 nucléotides marqués par un fluorophore différent entraîne un phénomène de FRET qui est accéléré en présence d'une chaperonne à ARN qui favorise l'appariement de brins. Ce signal FRET sera ensuite diminué en présence d'un ARN compétiteur et d'une chaperonne à ARN qui est capable de déplacement de brins. D'après (Rajkowitsch and Schroeder, 2007).

Il semblerait que HMG2L1 induise l'appariement et non le déplacement de brins. Cette donnée expliquerait d'autant mieux la favorisation du dimère d'ARN par rapport au monomère par HMG2L1. En effet, ce dernier comporte une large région où les deux entités sont appariées. C'est certainement dans cette région centrale que la dimérisation prend son origine. Ces premiers essais font même état d'une activité d'appariement très forte de HMG2L1. D'autres essais *in vitro* sont disponibles et il serait intéressant de tester la protéine HMG2L1 dans ces conditions (**figure 45**).

Les premiers essais ont également permis de montrer une forte inhibition de l'activité d'appariement par le PAR, ce qui nous permet de confirmer les expériences de retard sur gel réalisées précédemment.

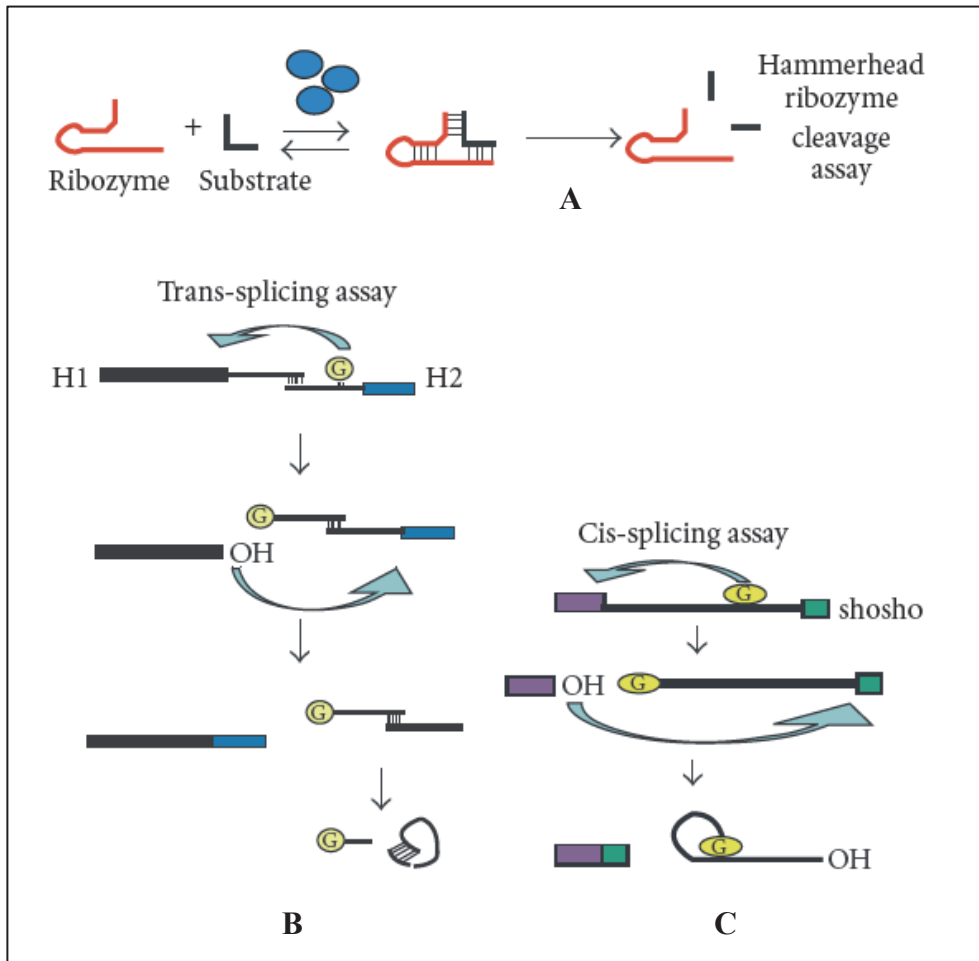


Figure 45 : autres tests d'activité chaperonne à ARN *in vitro*

Schéma illustrant les autres test d'activité chaperonne à ARN disponibles *in vitro*. A. Le clivage réalisé par le ribozyme dit tête de marteau (hammerhead) est accéléré en présence de chaperonnes à ARN. B. L'épissage en trans entre de l'intron de type 1 libère la partie H1 en 5' et H2 en 3'. L'activité de la potentielle chaperonne est mesurée à basse température. C. L'épissage en cis de l'intron est mesurée en présence de la potentielle chaperonne à 37°C. Il permet la réunion des deux exons shosho de respectivement 27 et 2 nucléotides. D'après (Semrad, 2011).

3. Discussion et perspectives

Les études de protéomique ont montré que HMG2L1 est intimement liée aux processus relatifs à l'ARN. En effet, la présence de multiples protéines liant les ARN dont des hélicases nous a conduit à ouvrir ce chapitre. Nos résultats suggèrent que HMG2L1 est une chaperonne à ARN qui faciliterait l'appariement de brins et que cette activité est modulée par le PAR.

Néanmoins, ce résultat n'a été obtenu que dans des conditions *in vitro*, ce qui une fois de plus ne nous permet pas de lier cette activité à une fonction cellulaire. Nous avons pourtant émis l'hypothèse que HMG2L1 pouvait être impliquée dans le processus de transcription/maturation des ARNr et l'assemblage subséquent des ribosomes.

En effet, nous avons privilégié cette voie à la lumière des différents éléments dont nous disposons. Premièrement, PARP-1 agit sur la structure de l'hétérochromatine des gènes d'ADNr chez les mammifères et elle intervient dans la maturation des ARNr et l'assemblage du ribosome chez la drosophile, ainsi même si cela n'a pas été montré chez les mammifères nous avons tout de même pris en compte cette donnée (Boamah et al., 2012; Guetg et al., 2012). Deuxièmement, HMG2L1 a une localisation nucléolaire et sa surexpression entraîne un stress nucléolaire, elle joue donc certainement un rôle la biogenèse des ribosomes. Troisièmement, la protéomique a permis de mettre à jour de nombreux interactants directement liés à ce processus comme les protéines ribosomales – dont certaines possèdent également une activité ARN chaperonne – mais aussi des protéines impliquées dans l'épissage et la modification de l'ARNr. Il faut souligner que nombre de ces protéines sont déjà décrits comme des partenaires de PARP-1, PARP-2, PARG ou liant le PAR (Gagne et al., 2003; Gagne et al., 2008; Isabelle et al., 2010). Lors de la maturation de l'ARNr 18s, il faut qu'un duplex d'ARN se forme entre le pré-ARNr et un snoARN et celui-ci est permis par les protéines Imp3p et Imp4p chez la levure (Gerczei and Correll, 2004). Nous avons en conséquence entamé un chapitre concernant cette question.

Si HMG2L1 est effectivement une chaperonne à ARN en permettant l'appariement de brins, alors il sera difficile de le prouver avec les tests *in vivo* d'activité chaperonne à ARN disponibles actuellement. En effet, ces essais permettent surtout de vérifier une activité de dissociation de brins. C'est le cas du test de l'intron (où la dissociation est nécessaire à l'épissage) ou du test d'anti-terminaison de transcription (où la dissociation entraîne la poursuite de la transcription), dans les deux cas la chaperonne à tester doit dissocier un duplex d'ARN pour donner l'effet escompté (Rajkowitsch et al., 2007) (**figure 46**). Nous aurons donc à trouver la fonction précise de HMG2L1 dans le nucléole et dans l'assemblage des ribosomes pour définir précisément l'étape sur laquelle elle intervient.

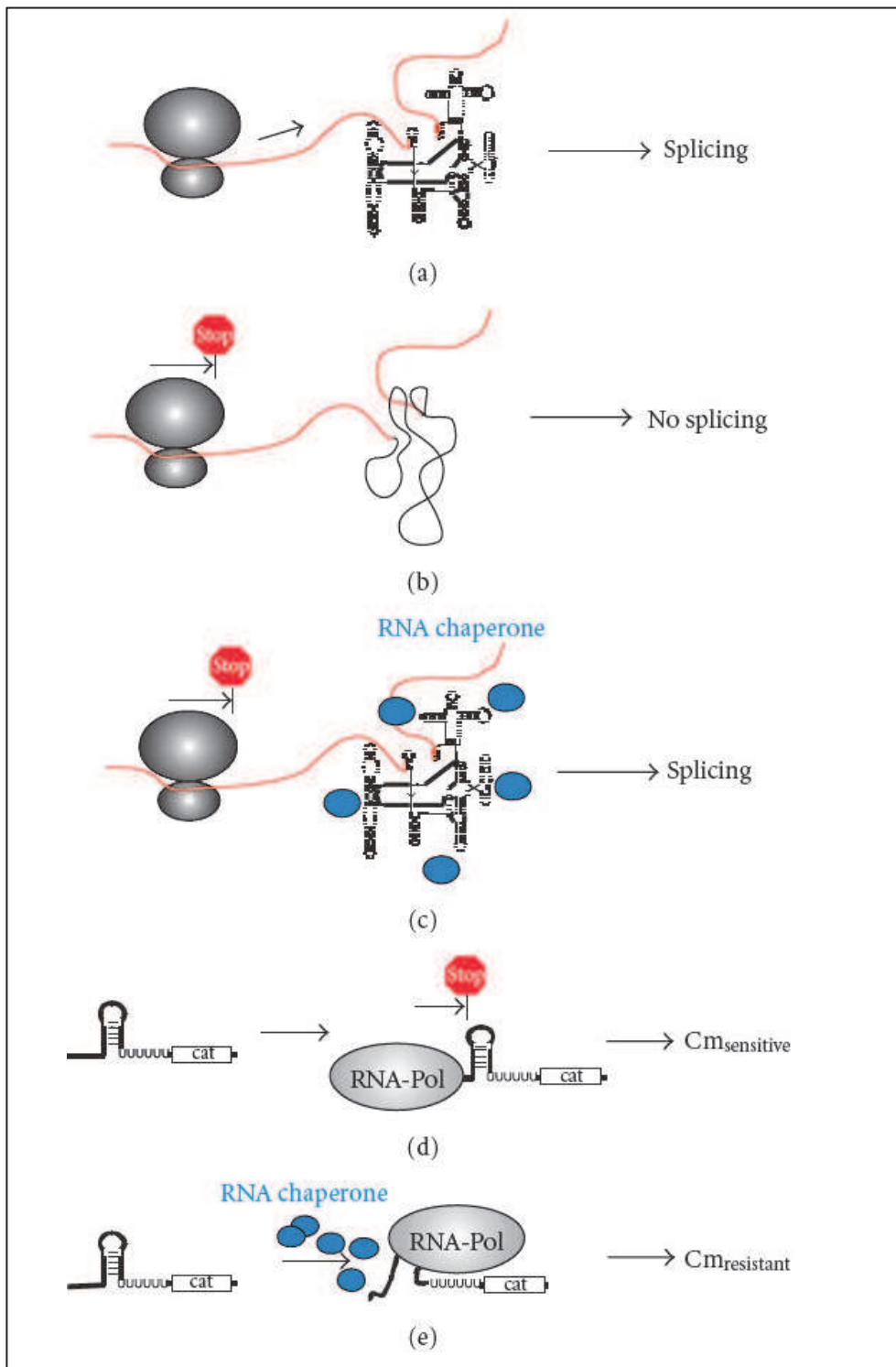


Figure 46 : tests d'activité chaperonne à ARN *in vivo*

A-B-C. Test *in vivo* du piège cinétique. A. Lorsque la traduction est efficace, l'épissage a lieu correctement. B. A l'inverse, si la traduction est inhibée, l'épissage est entravé. C. La potentielle chaperonne à ARN est ajoutée et le test consiste à vérifier si l'épissage a lieu. D-E. Test *in vivo* d'anti-termination de transcription. D. La tige boucle de terminaison de transcription peut se replier et permet l'arrêt de la transcription du gène de la chloramphénicol acétyl -transférase. La cellule est donc sensible au chloramphénicol. E. En présence de chaperonne à ARN, la tige boucle est dissociée et la transcription est permise, ce qui rend la cellule résistante au chloramphénicol. D'après (Semrad, 2011).

V. HMG2L1 dans la biogenèse des ribosomes

1. Introduction

Nous avons entamé cette question en partant du postulat que HMG2L1 peut être impliquée dans la biogenèse des ribosomes en jouant potentiellement sur la transcription ou sur les étapes de maturation des ARNr ou d'assemblage des ribosomes. Nous avons donc séparé ces deux problématiques et tenté de montrer l'implication de HMG2L1 dans l'un ou l'autre des processus.

2. HMG2L1 ne semble pas contrôler la transcription des ADNr

Nous avons tenté de répondre à cette problématique par l'intermédiaire de deux types d'expériences basées sur le même principe : l'ADNr est transcrit en pré-ARNr 47s dont la durée de vie est de l'ordre de la minute car il est très rapidement maturé en un pré-ARNr 45s plus stable. En ciblant ce pré-ARNr 47s, nous avons un aperçu rapide de la transcription dans une cellule à un moment t.

2.1. La surexpression de HMG2L1 entraîne un arrêt de la transcription des ADNr

Nous avons dans un premier temps procédé à des immunofluorescences suite à l'incorporation brève de BrUTP (Bromo-Uridine-TriPhosphate), un nucléotide marquant principalement les ARNr parce qu'ils sont les plus activement transcrits (Grob et al., 2009). Nous avons réalisé cette expérience dans des cellules HeLa surexprimant la protéine GST-HMG2L1, nous permettant ainsi de vérifier l'impact de HMG2L1 sur la transcription. Cette expérience nous a permis de montrer que la forte surexpression de GST-HMG2L1 entraîne un arrêt de la transcription des ADNr (**figure 47**). Ce résultat est à mettre en parallèle avec la formation de chapeaux nucléolaires que nous avons déjà observé au préalable. Il est difficile de déterminer si la protéine agit directement sur la transcription ou si elle induit un stress nucléolaire qui logiquement entraîne également l'arrêt de la transcription. Néanmoins, les cellules exprimant modérément GST-HMG2L1 ne semblent pas incorporer moins de BrUTP que les cellules non-transfectées, même si ce type d'expérience ne permet pas de quantifier

précisément un taux d'incorporation. Il semblerait donc que ce soit la surexpression de la protéine qui conduise à un stress nucléolaire et dont un des effets secondaires est l'arrêt de la transcription des ADNr. Nous avons donc voulu observer si l'absence de HMG2L1 pouvait avoir un impact sur la transcription.

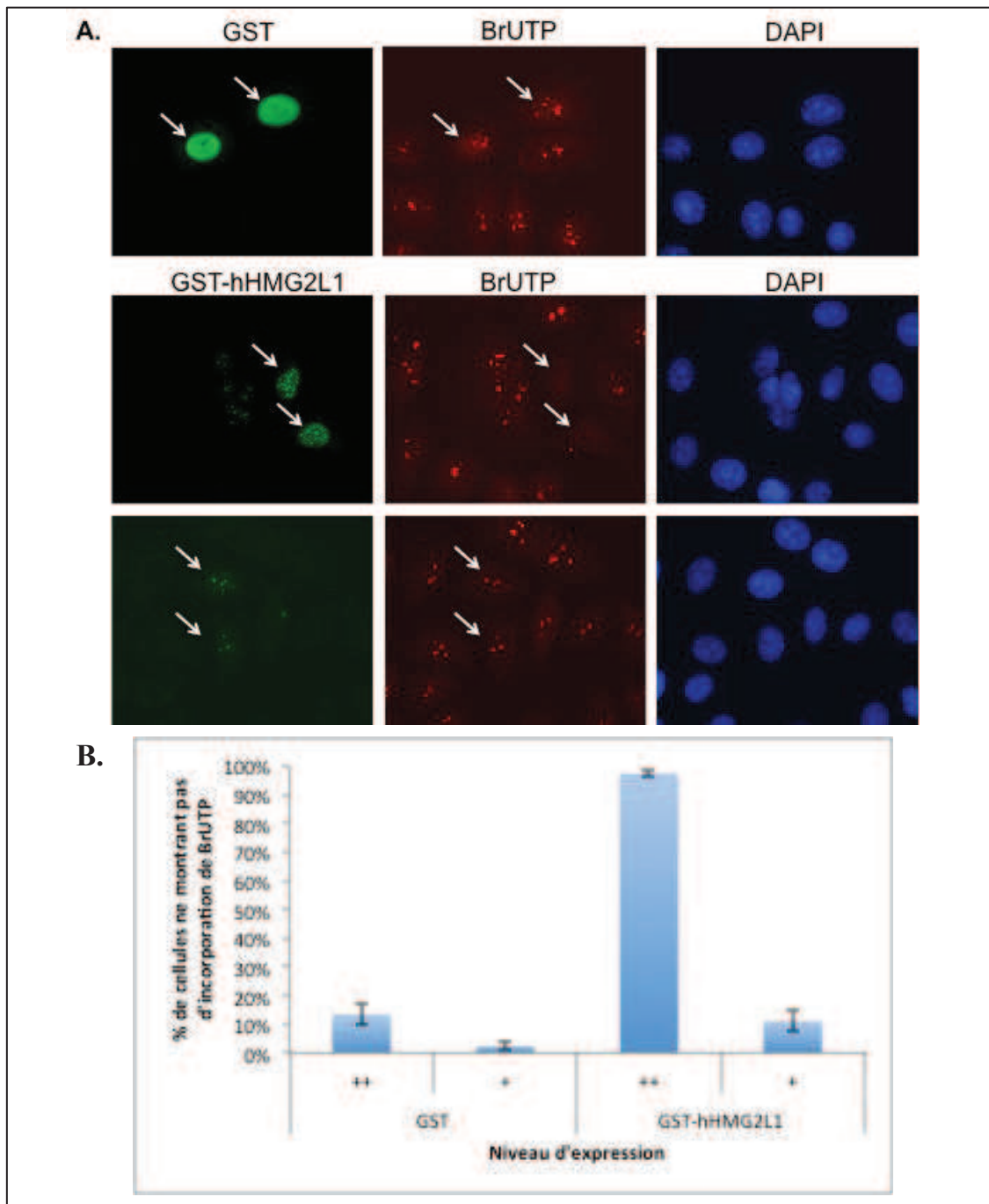


Figure 47 : la surexpression de HMG2L1 induit un arrêt de la transcription des ADNr

A. Immunofluorescences avec incorporation de BrUTP montrant que la forte surexpression de GST-hHMG2L1 (flèches sur les panneaux du milieu) induit l'arrêt de la transcription des ADNr caractérisée par une diminution de l'incorporation de BrUTP. En revanche, la GST ou GST-hHMG2L1 faiblement surexprimée ne semblent pas impacter sur le taux de transcription (panneaux du haut et du bas). B. Graphique regroupant la quantification de 3 expériences indépendantes.

2.2. La déplétion de HMG2L1 n'a pas d'impact sur la transcription des ADNr

Pour répondre à la question concernant le potentiel rôle actif de HMG2L1 dans le contrôle de la transcription des ADNr, nous avons décidé de prendre le problème de l'autre versant, c'est-à-dire en l'absence d'HMG2L1 alors qu'avant nous regardions l'impact de la surexpression. Pour cela, nous avons tenté de générer une lignée cellulaire HeLa stable déficiente en HMG2L1 à l'aide de vecteurs épisomaux codant pour un shARN. Néanmoins, les 3 lignées clonales obtenues ont montré trop de variations entre elles en ce qui concerne leurs degrés de prolifération. Mais surtout, un phénomène de compensation s'était probablement mis en place. En effet, les clones ont mis du temps à apparaître, mais dès que ce fut le cas, les cellules se sont à nouveau divisées très rapidement. Nous avons donc décidé de dépléter HMG2L1 transitoirement à l'aide de transfections de siARN. Dans ce cas, la déplétion était très efficace mais les cellules ne semblaient pas outre mesure affectées par l'absence de la protéine. Ce résultat nous conforta dans notre choix précédent de nous passer des lignées stables.

Nous avons donc purifié les ARN à partir de cellules déplétées en HMG2L1 ou nucléoline (contrôle positif dont l'absence entraîne une diminution du taux de transcription des ADNr) pendant 96h et procédé à la qRT-PCR avec des oligonucléotides dirigés contre HMG2L1, nucléoline, GAPDH et 5'ETS (la partie 5' du pré-ARNr 47s qui est rapidement excisée lors du processus de maturation) (Cong et al., 2012; Grandori et al., 2005). Après analyse, il s'avère que l'absence de HMG2L1 n'a absolument aucun impact sur la transcription de l'ADNr au contraire de la déplétion de la nucléoline qui entraîne bien une diminution de 50% du taux de transcription, comme attendu (**figure 48**). Un point intéressant concerne l'impact de la déplétion de HMG2L1 sur l'expression de la nucléoline. En effet, l'absence de HMG2L1 entraîne une chute de moitié de l'expression de la nucléoline. En revanche, cette diminution ne semble pas être suffisante afin d'impacter la transcription des ADNr comme c'est le cas lors de la déplétion de la nucléoline. Il sera néanmoins intéressant de tester par western-blot s'il y a une diminution de la quantité de nucléoline lors de la déplétion de HMG2L1.

Nous ne pouvons toutefois pas exclure que la déficience n'est pas forcément suffisante pour observer un impact important (il demeure toujours ~10% de la protéine totale endogène). Ainsi, HMG2L1 ne semble pas impacter directement sur la transcription des ADNr, néanmoins sa surexpression entrainerait un stress nucléolaire qui serait à l'origine de l'arrêt de la transcription.

Des tests de transcription *in vitro* utilisant des plasmides rapporteurs mimant le promoteur minimum des gènes d'ADNr pourraient être réalisés afin de mesurer l'impact de l'addition de la protéine HMG2L1 sur l'efficacité de la transcription (Santoro and Grummt, 2001).

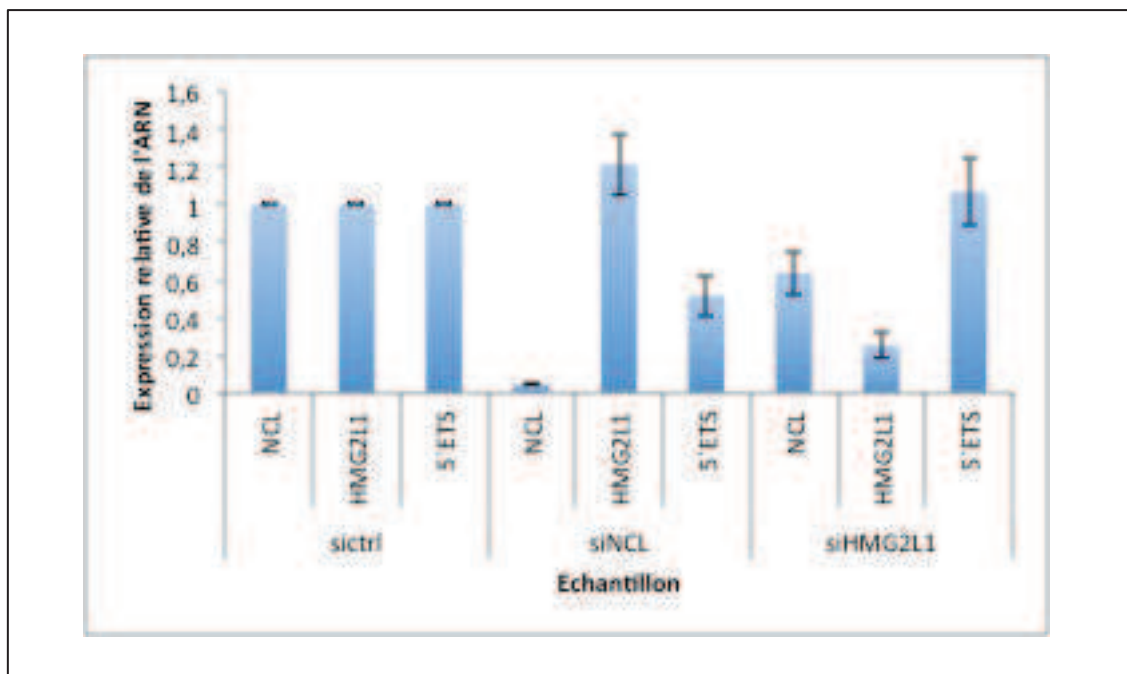


Figure 48 : L'absence de HMG2L1 n'a pas d'impact sur la transcription des ADNr

Graphique montrant l'impact de la déplétion de la nucléoline (siNCL) ou de HMG2L1 (siHMG2L1) sur la transcription des ADNr. La déplétion a été réalisée dans des cellules HeLa à l'aide de siARN dirigés contre l'ARNm de chacun des gènes. Le taux de transcription des gènes de la nucléoline, de HMG2L1 et des ADNr a été mesuré à l'aide d'une RT-qPCR. Ctrl : siARN contrôle. Ce graphique représente 2 expériences indépendantes.

3. HMG2L1 dans l'assemblage du ribosome

Nous avons voulu vérifier la potentielle action de HMG2L1 sur la biogenèse des ribosomes en ayant recours à des expériences de purification de polysomes (Boamah et al., 2012). Le terme polysome définit l'association de plusieurs ribosomes sur un ARNm lors du processus de traduction. Au laboratoire, Jean-Christophe Amé a utilisé des cellules HeLa déficientes en HMG2L1 par siARN ou des cellules HEK surexprimant GFP-hHMG2L1 et procédé à une séparation des polysomes sur gradient de sucrose. Dans les deux cas, nous n'avons jamais pu observer de réel impact sur les profils de sédimentation (résultats non présentés). Malgré l'interaction probable entre HMG2L1 et un grand nombre de protéines ribosomales, il semblerait que HMG2L1 n'a pas d'impact sur le processus d'assemblage du ribosome.

4. Discussion et perspectives

Les premières données concernant la localisation nucléolaire de HMG2L1, sa colocalisation avec UBF et l'observation de l'arrêt de la transcription lorsque la protéine est surexprimée nous ont conduit à poser l'hypothèse selon laquelle elle pouvait contrôler la transcription de l'ADNr. De plus, la protéine n'a pour le moment qu'une seule fonction connue, celle de la régulation de la transcription. Néanmoins, il est vrai que si nous nous basons sur le résultat de la protéomique, HMG2L1 semble interagir avec des protéines intervenant plus tardivement dans la biogenèse des ribosomes et non dans l'étape de la transcription des ADNr ribosomiques. Rappelons que PARP-1 avait été localisée dans le nucléole depuis un certain temps mais que ses fonctions viennent à peine d'être découvertes. Il est donc certain que HMG2L1 joue un rôle dans le nucléole mais nous n'avons pas encore tous les outils et données nécessaires à sa caractérisation.

HMG2L1 appartient au complexe de remodelage de la chromatine NURF et comme nous l'avons vu en introduction, un parallèle peut être fait avec la protéine SSRP1 contenant elle aussi un domaine HMG et appartenant au complexe de remodelage de la chromatine FACT. Or, l'activité de ce complexe est directement modulée par PARP-1 et son activité catalytique (Huang et al., 2006). Il a également été montré que ce complexe intervient dans la transcription par l'ARN pol I et l'ARN pol III (Birch et al., 2009). Nous pouvons ainsi

imaginer que HMG2L1 puisse interagir avec la chromatine ribosomale à travers le complexe NURF, même si l'implication de ce complexe dans la modulation de la transcription des ADNr n'a pas encore été montrée. Si l'expérience de CHIP-seq proposée dans le paragraphe III venait à montrer que HMG2L1 est une protéine liée à la chromatine ribosomale, nous aurions alors à comprendre pourquoi l'absence de la protéine n'a pas d'impact sur la transcription. A moins que HMG2L1 ne soit impliquée avec PARP-1 dans l'hétérochromatinisation des gènes d'ADNr transcriptionnellement éteints par la cellule, auquel cas il serait certainement intéressant de vérifier l'impact d'une double déplétion HMG2L1 et PARP-1 sur le taux de transcription des ADNr (Guettg et al., 2012).

En ce qui concerne les étapes de maturation des ARNr ou d'assemblage du ribosome, nous n'avons pas pu montrer d'impact de l'absence ou de la surexpression de la protéine HMG2L1 sur ce processus. D'autres expériences sont nécessaires afin de confirmer ou d'infirmer ces premières observations. Il s'agirait par exemple de procéder à des Northern-blots sur les différents intermédiaires du processus de maturation du pré-ARNr. Pour cela, il suffit de choisir des oligonucléotides dirigés contre des segments qui sont excisés à des étapes différentes de la maturation (**figure 49**).

Ainsi, il serait aisé de déterminer l'étape précise du processus est qui pourrait être touchée. Il s'avère que dans le cas de PARP-1, les auteurs ont montré une accumulation des pré-ARNr 47s et 36s (qui est à l'origine des ARNr 28s et 5,8s) mais n'ont détecté aucune problème particulier au niveau des produits finaux 18s ou 28s (Boamah et al., 2012). Par contre, ils observent tout de même une déficience au niveau des polysomes formés, indiquant que PARP-1 ou le PAR interviennent vraisemblablement aussi dans le processus d'assemblage. HMG2L1 agit peut-être uniquement sur la maturation mais n'est pas essentielle ou alors des mécanismes parallèles sont capables de compenser son absence. Une telle expérience nous indiquerait si HMG2L1 intervient dans ce mécanisme ou non.

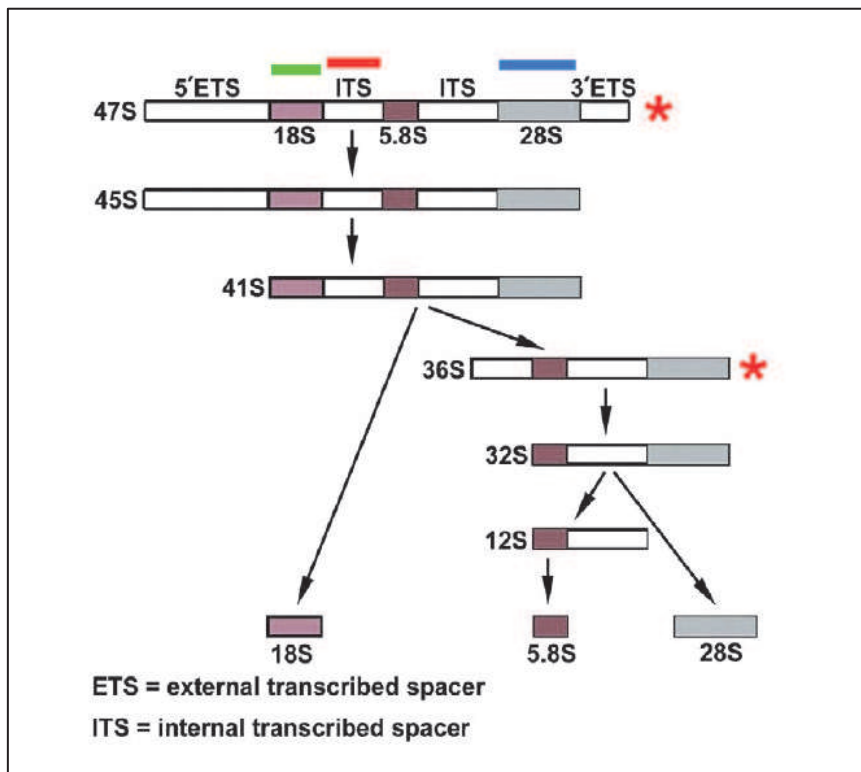


Figure 49 : Northern-blot ciblant les intermédiaires de la maturation du pré-ARNr

Schéma illustrant les étapes clés de la maturation du pré-ARNr 47s et les positions des trois oligonucléotides (barres verte, rouge et bleue) utilisés afin de suivre le cheminement de la maturation. Si une étape est entravée, un des intermédiaires (47s ou 36s suivant l'emplacement du problème) s'accumulera en northern-blot. D'après (Boamah et al., 2012).

Conclusion générale

1. HMG2L1, une protéine mieux caractérisée

Quant nous avons initié ce projet de thèse, la protéine HMG2L1 avait été très peu étudiée si ce n'est son rôle dans la régulation de la transcription (Yamada et al., 2003; Zhou et al., 2010). Néanmoins, le mode d'action de HMG2L1 dans ce processus est encore très peu défini à ce jour, excepté son appartenance au complexe de remodelage de la chromatine NURF (Vicent et al., 2011). HMG2L1 agit principalement en tant que co-régulateur transcriptionnel en interagissant avec des facteurs de transcription (myocardine, NLK) et en modulant leur action. La fonction de facteur de transcription et donc la probable interaction de HMG2L1 avec l'ADN a été évoquée à travers son rôle dans l'expression de la transposase du transposon *Sleeping beauty*, mais cela n'avait pas été démontré formellement (Walisko et al., 2008). En partant de la probable interaction entre HMG2L1 et PARP-1 que le laboratoire a observée en double-hybride, nous avons initié un projet dont les travaux nous ont permis de mieux caractériser la protéine HMG2L1 (**publication 2, figure 8**).

1.1. Une protéine à domaine HMG intrinsèquement désordonnée

Dans un premier temps, nous avons contribué à caractériser la structure modulaire de HMG2L1. En effet, en parallèle du domaine HMG déjà décrit dans la littérature, nous avons défini en N-terminal une région intrinsèquement désordonnée et basique tandis que nous avons détecté en C-terminal un domaine inconnu mais très conservé de la drosophile à l'homme. Nous avons également pu placer le domaine HMG parmi la classe II/III qui est caractérisée par la présence de protéines à HMG liant l'ADN de manière séquence indépendante. S'il sera difficile de déterminer la structure tridimensionnelle de la protéine complète étant donné son caractère désordonné en N-terminal, il serait intéressant de déterminer celle des domaines HMG et surtout C-terminal afin de comprendre la fonction de ce dernier. La structure complète serait possible si un interactant permettait de stabiliser la région désordonnée, ce qui nous aiderait à mieux préciser le fonctionnement de la protéine.

1.2. Une protéine nucléolaire

Dans un second temps, nous avons pu montrer que HMG2L1 est une protéine nucléaire et nucléolaire, plutôt localisée dans le centre fibrillaire avec UBF, la protéine à domaines HMG impliquée dans la transcription des ADNr. En outre, les études de protéomique que nous avons menées nous ont permis de confirmer cette observation car la plupart des interactants de HMG2L1 sont eux-mêmes nucléolaires et impliqués dans la biogenèse du ribosome ou entrent directement dans sa composition. Néanmoins, nous n'avons pas pu déterminer la(es) fonction(s) précise(s) de HMG2L1 dans cet organelle, ce qui demeure véritablement la question primordiale à laquelle il faudra répondre à l'avenir.

1.3. Un lien étroit avec les PARPs

Enfin, nous avons surtout caractérisé biochimiquement le lien entre HMG2L1 et les PARPs nucléolaires que sont PARP-1 et PARP-2. Nous avons montré leur interaction *in-vivo* et *in-vitro* permettant de confirmer qu'elles interagissent directement l'une avec l'autre. En outre, nous savons que PARP-1 et PARP-2 sont capables de poly(ADP-ribosyl)er HMG2L1 *in vitro* et que cette dernière interagit avec le PAR libre. Comme PARP-1 intervient dans la biogenèse des ribosomes en modulant la chromatine des gènes d'ADNr et en régulant le processus de maturation des ARNr chez la drosophile, il n'y avait qu'un pas à faire pour imaginer un lien fonctionnel entre ces trois acteurs.

De plus, PARP-1 ou la poly(ADP-ribosyl)ation sont impliquées dans des processus communs à HMG2L1 : voie Wnt ou transcription hormono-dépendante comme nous l'avons vu en introduction (Idogawa et al., 2007; Le May et al., 2012; Pavri et al., 2005). De plus, ici nous faisons l'hypothèse qu'elles interviendraient également dans la biogenèse des ribosomes. Le lien théorique entre HMG2L1 et le PAR est donc facilement établi, il reste donc encore de nombreux projets à ouvrir.

2. Caractérisation fonctionnelle de HMG2L1

2.1. HMG2L1 dans la modulation de la transcription

Nous savons que HMG2L1 appartient au complexe de remodelage de la chromatine appelé NURF qui intervient entre autres dans la transcription de gènes sous la dépendance d'hormones. Nous pourrions alors imaginer qu'elle n'intervient qu'à travers ce complexe, d'ailleurs le mécanisme moléculaire sous-tendant l'action de HMG2L1 dans la voie Wnt ou la dans la modulation de la différenciation des muscles lisses n'a pas été clairement défini. Elle pourrait donc être davantage impliquée dans la modulation de la chromatine au niveau des promoteurs afin de permettre ou non la transcription. Sa propension à lier fortement l'ADN via son domaine HMG lui permettrait alors d'encrer le complexe au promoteur ou encore de modifier sa structure en le liant avec son domaine HMG. En effet, le domaine HMG lie l'ADN et induit une courbure à la double-hélice, ce qui pourrait favoriser l'arrivée de nouveaux facteurs.

Nous avons initié deux types d'expériences qui visaient à montrer une éventuelle implication de HMG2L1 dans la régulation de la transcription : dans la voie Wnt chez l'homme et dans la transcription acide rétinoïque-dépendante, deux processus impliquant PARP-1 (Idogawa et al., 2007; Le May et al., 2012; Pavri et al., 2005). Dans le premier cas, il semblerait que HMG2L1 agisse sur la transcription dans des tests in vitro, mais en tant que facteur de transcription basal (et donc non spécifique à la voie Wnt) et dans le second cas nous n'avons observé qu'un léger délai dans la transcription en réponse à l'acide rétinoïque en l'absence de HMG2L1 (résultats non présentés). En conclusion, si HMG2L1 est effectivement impliquée dans la régulation de la transcription, d'autres études sont nécessaires afin de pouvoir préciser le mécanisme mis en jeu.

2.2. HMG2L1 dans la biogenèse des ribosomes

Cette question est certainement la plus excitante que nous ayons posée concernant HMG2L1. Nous avons grâce à plusieurs expériences pu montrer que HMG2L1 est intimement liée à la biogenèse des ribosomes. Néanmoins, nous ne possédons pour le moment que des faisceaux d'indices concordants mais aucune fonction n'a pu être mise à jour. Nous

savons tout de même grâce à la protéomique et à la caractérisation biochimique de HMG2L1, que la protéine est fortement liée aux processus relatifs à l'ARN. D'ailleurs, son activité ARN chaperonne est la fonction majeure sur laquelle nous devrions poursuivre les investigations.

En outre, cette activité peut très bien lui permettre d'intervenir dans des processus d'épissage ou de maturation des ARN comme nous l'avons vu, mais également dans la réparation de l'ADN, processus dans lequel les PARPs interviennent de manière ubiquitaire (voir Introduction, III.1.3). Ainsi, la protéine FUS (FUsed in Sarcoma) qui possède une activité chaperonne à ARN intervient également dans le mécanisme de réparation des cassures double-brin de l'ADN (Mastrocola et al., 2013). Le recrutement de la protéine aux sites de dommages est dépendant de l'activité de poly(ADP-ribosyl)ation. En outre, de plus en plus de protéines liant l'ARN sont impliquées dans la réparation de l'ADN et sont recrutées par le PAR au niveau du dommage, ce qui montre que nous devrions également poser cette question dans le futur (Adamson et al., 2012; Krietsch et al., 2012a).

Evidemment, la caractérisation de HMG2L1 et de sa relation fonctionnelle avec PARP-1 n'en est qu'à ses balbutiements, même si les études précédentes et les données que nous apportons permettent d'y voir plus clair. Si HMG2L1 semble clairement impliquée dans la régulation de la transcription, nous ne savons pas encore de quelle manière. Joue-t-elle le rôle de facteur de transcription, de cofacteur transcriptionnel ou de modulateur de la structure de la chromatine ? D'autre part, sa fonction nucléolaire dans la biogenèse des ribosomes reste également à déterminer. Il semblerait toutefois que ses fonctions soient complexes à déterminer, si bien que nous pouvons faire le parallèle avec ses propriétés biochimiques particulières et sa structure secondaire majoritairement intrinsèquement désordonnée. Nous pouvons énoncer l'hypothèse qu'elle aura certainement des rôles cellulaires variés car cette propriété lui offre de multiples possibilités d'interactions dont nous avons à peine entamé le catalogue.

Annexes techniques

I. Matériels

1. Lignées cellulaires

Nous avons utilisé tout au long de ce travail des lignées cellulaires humaines HeLa et HEK293T. En outre, les tentatives d'établissement de lignées stables déficientes en HMG2L1 ou exprimant la protéine GFP-HMG2L1 ont été réalisées dans les cellules HeLa. Les cellules ont été cultivées dans du milieu de culture classique DMEM – 10% serum de veau fœtal – 50 µg/mL gentamycine. Les cellules HeLa et HEK293T ont été respectivement transfectées avec les agents de transfection Lipofectamine2000 (Invitrogen) et jetPEI (Polyplus) selon les indications du fabricant.

2. Constructions plasmidiques

Nous avons sous-cloné l'ADNc de hHMG2L1 à partir du vecteur pcDNA3.1/Zeo(+)-hHMG2L1-HA (Walisko et al., 2008) dans des vecteurs d'expression eucaryotique pEGFP-C3 (Clontech, fusion GFP), pBC2 (Chatton et al., 1995), pEYFP-C1/pEYFP-C1-mTK/pEYFP-C1-TK (Clontech, fusions YFP avec promoteurs normal (TK) et minimal (mTK) de la thymidine kinase) ou dans le vecteur d'expression procaryotique pET-15b (Novagen, fusion 6his). L'insertion a été réalisée via les sites de restriction HindIII/KpnI (pEGFP-C3 et pBC2), BglII/KpnI (pEYFP-C1) et NdeI/BamHI (pET-15b). Les formes tronquées de HMG2L1 ont été obtenues par PCR et intégrées au niveau des mêmes sites de restriction. Quand nécessaire, nous avons également intégré un signal de localisation nucléaire (Schreiber et al., 1992)NLS du large T SV-40) à certaines formes tronquées afin de forcer leur localisation dans le noyau.

3. Anticorps

Le **tableau 4** regroupe les anticorps utilisés pour les expérimentations relatives aux résultats non publiés.

Anticorps	Espèce	Dilution	Anticorps secondaire	Fournisseur
Anti HMG2L1 3B4	Souris	WB : 1/2000	GAM-HRP 1/20000	Sigma
Anti HMG2L1 H-179	Lapin	WB : 1/200	GAR-HRP 1/50000	Santa-Cruz
Anti HMG2L1 K-13	Chèvre	WB : 1/200	RAG-HRP 1/5000	Santa-Cruz
Anti α -tubuline	Souris	WB : 1/1000	GAM-HRP 1/20000	Sigma
Anti BrdU	Souris	IF : 2/7	GAM-Alexa594 1/2000	BD Bioscience
Anti GST	Lapin	IF : 1/2000	GAR- Alexa488 1/2000	Sigma

Tableau 4 : liste des anticorps utilisés

4. SiARN et oligonucléotides

Les siARN dirigés contre les ARNm humains de la nucléoline et de HMG2L1 (mélange de 4 siARN) ainsi que le siContrôle ont été fournis par Dharmacon.

Les oligonucléotides utilisés pour la RT-pPCR ont été synthétisés et purifiés par Sigma. Les séquences sont données dans le **tableau 5**.

Nom du gène testé	Séquence 1	Séquence 2
GAPDH	TGGTATCGTGGAAGGACTCA	TTCAGCTCAGGGATGACCTT
Nucléoline	AAATGGCTCCTCCTCCAAAG	GTGGCAACTGCAACCTTTTT
HMG2L1	ATGTCGGCCTACCAGGTGT	CCACACCTCAGCCAGTTTTT
5'ETS (pré-ARNr 47s)	CCTGCTGTTCTCTCGCGCGTCCGAG	AACGCCTGACACGCACGGCACGGAG

Tableau 5 : liste des oligonucléotides pour la RT-qPCR

II. Méthodes

1. Purification de nucléoles

Le protocole qui a été utilisé pour purifier les nucléoles à partir de cellules HeLa en culture est décrit sur le site internet du laboratoire spécialisé en protéomique nucléolaire de A.I. Lamond (<http://www.lamondlab.com/f5nucleolarprotocol.htm>). Brièvement, les cellules HeLa ont été cultivées jusqu'à 90% de confluence dans 10 boîtes de 14 cm de diamètre. Une heure avant la récupération des cellules, le milieu a été remplacé par du nouveau milieu préchauffé. Après 3 lavages avec du PBS chaud, les cellules sont récupérées par trypsinisation à l'aide d'une solution de trypsine/EDTA. Après inactivation de la trypsine par du milieu de culture, les cellules sont lavées dans du PBS froid et centrifugées à 1000 rpm. Les cellules sont alors reprises dans un tampon hypotonique (10 mM Hepes pH 7.9, 10mM KCl, 1.5mM MgCl₂, 0.5mM DTT) et incubées 5 min à 4°C. Au microscope à contraste de phase, les cellules apparaissent gonflées. Après ajout de 0,1% NP-40 final, les cellules sont transférées dans un douce et homogénéisées une trentaine de fois avec un piston (type B). L'éclatement des cellules est vérifié au microscope après ajout de bleu de trypan. Une fraction est conservée comme extrait total. Les noyaux sont centrifugés à 1000 rpm pendant 5 minutes à 4°C. Le culot est repris délicatement dans 3 mL de tampon S1 (0.25 M Sucrose, 10 mM MgCl₂) et déposé délicatement sur un coussin de 3 mL de tampon S2 (0.35 M Sucrose, 0.5 mM MgCl₂) et les noyaux sont centrifugés à 2500 rpm pendant 5 min à 4°C. Le surnageant est conservé comme fraction cytoplasmique et le culot contenant des noyaux propres dépourvus de fragments cytoplasmiques est repris dans 3 mL de tampon S2. Un aliquot est conservé comme fraction nucléaire. Les noyaux sont soniqués 5 x 10 sec à 4°C avec 10 secondes d'intervalle entre chaque pulse. Les nucléoles sont alors observés au microscope à contraste de phase. Cette solution est déposée délicatement sur un coussin de 3 mL de solution S3 (0.88 M Sucrose, 0.5 mM MgCl₂) et les nucléoles sont centrifugés à 3500 rpm pendant 10 min à 4°C. Le surnageant est conservé comme fraction nucléoplasmique et le culot contenant les nucléoles est repris dans 0.5 mL de solution S2. Les nucléoles sont centrifugés à 2500 rpm pendant 5 min à 4°C. Enfin, le culot est repris dans 0.5 mL de solution S2.

Après quantification des protéines de chaque fraction par Bradford, une quantité équivalente est déposée sur gel SDS-PAGE 10%. Après migration et transfert sur membrane de nitrocellulose, un western-blot permet de vérifier la présence de la protéine HMG2L1 dans la fraction nucléolaire. La protéine α -tubuline sert de contrôle afin de vérifier qu'il n'y a pas de contamination cytoplasmique, tandis que la protéine UBF permet de vérifier l'enrichissement de la fraction nucléolaire.

2. Etude de la transcription des ADNr par incorporation de BrUTP

Le protocole utilisé pour l'incorporation de BrUTP suivi d'une immunofluorescence est décrit dans cette étude (Grob et al., 2009). Brièvement, les cellules HeLa sont cultivées sur une lamelle en plastique dans les puits de plaques 6 puits. Les cellules sont transfectées 48 h avant l'expérience avec les vecteurs d'expression codant pour les protéines GST ou GST-HMG2L1. Les cellules sont lavées trois fois au PBS le lendemain. Le jour de l'expérience, les lamelles sont transférées dans des puits de plaques 24 puits préchauffées. Les cellules sont lavées 2 fois avec du tampon KH (10mM HEPES, 30mM KCl, pH7,4) préchauffé puis incubées 10 min à 37°C avec du tampon KH + 10 mM BrUTP (Sigma, ref: B7166) préchauffé. Les cellules sont ensuite lavées 3 fois avec du milieu chaud et incubées 30 min avec du milieu chaud + 20% de serum de veau fœtal. Enfin, les cellules sont lavées 2 fois au PBS avant d'être fixées 20 min à -20°C avec du méthanol 100%.

Les cellules sont lavées dans une solution de PBS – triton 0.1% – lait 0.1% puis incubées 2 h à température ambiante avec les anticorps primaires @BrdU et @GST (voir **tableau 4**). Après lavage dans la même solution, les cellules sont incubées avec les anticorps secondaires pendant 2 h à température ambiante. Les noyaux sont ensuite colorés au DAPI 25 ng/mL, les cellules lavées à l'eau distillée puis les lamelles sont montées sur des lames en verre sur une goutte de Mowiol. Les observations microscopiques sont réalisées à l'aide d'un microscope Leica DMRA2 (Leica Microsystems, Heidelberg, Allemagne) équipé d'une caméra CCD ORCA-ER (Hamamatsu) et du logiciel Openlab (Improvision).

3. Etude de la transcription des ADNr par RT-qPCR

3.1. Déplétion des cellules en HMG2L1 ou nucléoline

Les cellules HeLa sont cultivées pendant 120 h en plaque 6 puits et transfectées deux fois à 24 h et 72 h avec des 25 nM de siARN dirigés contre l'ARNm de HMG2L1 ou de la nucléoline. En contrôle négatif, d'autres cellules ont été transfectées avec la même quantité de siCtrl. Les cellules ont été lavées et le milieu a été remplacé 24 h avant leur récupération dans 1 mL de TRIzol (Invitrogen, ref: 15596-026).

3.2. Purification des ARN et rétrotranscription

Les ARN ont été purifiés suivant les instructions d'Invitrogen relatives à l'utilisation du TRIzol. Une fois les ARN purifiés, ils ont été repris dans 20 µL d'eau déminéralisée et leur concentration a été mesurée à 260nm à l'aide d'un spectrophotomètre de type NanoVue (GE Healthcare). Le rapport A_{260}/A_{280} était alors inférieur à 2. Des quantités équivalentes d'ARN ont été traitées à la DNase I (Promega RQ1 RNase-free DNase ref: M6101) afin d'éliminer les ADN contaminants. Les ARN dépourvus d'ADN contaminants ont été purifiés sur colonne (Macherey-Nagel, RNA clean-up XS) et la concentration a été à nouveau mesurée à l'aide du spectrophotomètre. Cette fois les rapports A_{260}/A_{280} étaient supérieurs à 2, ce qui est attendu pour des ARN purs.

Les ARN (1 µg) ont été rétrotranscrits à l'aide de l'enzyme AMV reverse transcriptase (Finnzymes, ref: F-570) suivant les instructions du fournisseur, en présence d'amorces de type hexamères aléatoires (random hexamers, Roche), de dNTPs (Sigma, ref: D7295) et de RNase-out (Invitrogen). Après l'incubation, les ADNc ont été dilués au 1/2 dans de l'eau déminéralisée.

3.3. Quantification de l'expression des gènes par RT-qPCR

La quantification de l'expression des gènes a été réalisée à l'aide d'un appareil de type StepOnePlus (Invitrogen) à l'aide de la technologie SYBRgreen. Le mix réactionnel a été fourni par Qiagen (QuantiTect SYBR-green PCR kit) et la PCR a été réalisée selon les instructions du fabricant. Les ADNc ont été dilués au 1/10 dans une solution contenant le mix réactionnel et les oligonucléotides (**tableau 5**) dans une concentration finale de 0.5 μ M. Les étapes de la PCR ont été programmées comme suit : une première **dénaturation** de 15 min à 95°C (permet d'activer la Taq polymérase), ensuite un cycle répété 45x contenant 3 étapes (**dénaturation** 15 sec à 95°C – **hybridation** 20 sec à 60°C – **polymérisation** 20 sec à 72°C) et une dernière étape de **polymérisation** de 10 min à 72°C. Enfin, l'établissement des courbes de fusion de chaque produit de PCR a permis de vérifier l'existence d'un seul pic et a donc permis de vérifier la qualité des couples d'amorces. Chaque réaction a été réalisée en triplicate et l'analyse des points de croisement a été traitée à l'aide du logiciel Excel (Microsoft).

4. Purification de 6his-HMG2L1

4.1. Production de la protéine dans *E. coli*

La souche *E. coli* BL21-DE3 (Agilent) a été transformée par électroporation avec 1 ng de vecteur pET-15b-hHMG2L1. Les clones ont été cultivés sur LB-Agar + ampicilline 50 μ g/mL (Amp) à 37°C pendant la nuit. Le lendemain, un clone a été choisi pour induire la production de la protéine dans 1 L de milieu LB+Amp à 12°C pendant 24h à l'aide de 0,5 mM IPTG (IsoPropyl β -D-1-ThioGalactopyranoside). Après la production de la protéine, les bactéries sont récupérées et lavées 2 fois avec du PBS froid puis culotées afin d'être conservées à -80°C.

4.2. Lyse des bactéries

L'équivalent de 0.5 L de culture bactérienne est repris dans 20 mL de tampon de lyse (25 mM Tris-HCl pH8, 50 mM glucose, 10 mM EDTA, 15 mM DTT, inhibiteurs de protéases) et les bactéries sont soniquées 6 x 20 sec à 4°C avec 30 sec de repos entre chaque pulse (puissance 4). Après ajout de 20 mL de tampon de solubilisation (2% Triton X-100, 2% NP-40, 2M NaCl), les bactéries sont incubées sur la roue à 4°C pendant 30 min. Par la suite, le lysat est clarifié par centrifugation à 12000 rpm pendant 30 min à 4°C puis filtré sur 0,22µm (Millipore). Le lysat est enfin dilué au 1/5 afin de diminuer la concentration en NaCl et détergent (25 mM Tris-HCl pH8, 5 mM glucose, 10 mM EDTA, 15 mM DTT, 0.2% Triton X-100, 0.2% NP-40, 200 mM NaCl, inhibiteurs de protéases). A ce stade, le lysat peut être chargé sur une colonne.

4.3. Colonne d'héparine

Les 200 mL de lysat sont déposés sur une colonne d'héparine de 40mL, le tout dirigé par ordinateur via l'Akta Purifier (GE Healthcare). La fraction de 200mL comprenant les protéines non retenues est conservée. Après un lavage équivalent à 5 volumes de colonne avec le tampon A (20 mM Tris-HCl pH8), la protéine est éluée à l'aide d'un gradient de NaCl réalisé à l'aide d'un mélange progressif entre le tampon A et le tampon B (20 mM Tris-HCl pH8, 1 M NaCl) jusqu'à atteindre 1 M NaCl. La charge, les lavages et les éluations sont suivies par ordinateur à l'aide du logiciel Unicorn (GE Healthcare) qui prend les mesures de DO₂₃₀, DO₂₅₄ et DO₂₈₀ ainsi que les valeurs de conductimétrie. L'éluat est récupéré en fractions de 10mL. Après dépôt sur gel SDS-PAGE des fractions pour déterminer celles qui contiennent HMG2L1, celles-ci sont mélangées et diluées au 3x pour diminuer la concentration en NaCl qui atteignait ~600 mM à la sortie de l'héparine (20 mM Tris-HCl pH8, 200 mM NaCl, 30 mM imidazole). La protéine est prête à être déposée sur la colonne HiTrap (GE Healthcare).

4.4. Colonne HiTrap

Les 200 mL contenant HMG2L1 après la purification sur colonne d'héparine sont déposés sur une colonne HiTrap de 1 mL à l'aide d'une pompe péristaltique à raison de ~1 mL/min. La fraction de 200 mL contenant les protéines non retenues est conservée. Après

lavage de la colonne avec l'équivalent de 20 volumes de colonne (20 mM tampon phosphate, 0.5 M NaCl, 30 mM imidazole), la protéine est éluée en augmentant la concentration d'imidazole (20 mM tampon phosphate, 0.5 M NaCl, 500 mM imidazole) et récupérée en fractions de 1 mL. Après dépôt sur gel SDS-PAGE, les fractions contenant HMG2L1 sont mélangées et la protéine est prête à être dialysée.

4.5. Dialyse, concentration et quantification

La protéine étant dans une solution contenant 500 mM imidazole et 500 mM NaCl, il fallait la dialyser afin de pouvoir l'utiliser dans expériences ultérieures. Pour cela, la solution a été dialysée contre le tampon de dialyse (20 mM Tris-HCl pH8, 5% glycérol, 100 mM NaCl, 1 mM DTT). Après dialyse, la protéine est concentrée sur des colonnes Amicon (Millipore) conformément aux instructions du fabricant.

Enfin, la protéine n'étant pas purifiée sous la forme d'une seule bande mais partiellement dégradée, il était impossible de quantifier la protéine par spectrophotométrie. La protéine a donc été déposée sur gel SDS-PAGE en compagnie d'un gradient de BSA, ce qui permet d'estimer la quantité de protéine complète.

Publication 3

Purification of Recombinant Poly(ADP-Ribose) Polymerases

Jean-Christophe Amé, Thomas Kalisch, Françoise Dantzer and Valérie Schreiber

Methods in Molecular Biology (2011) vol. 780 pp. 135-52

Chapter 9

Purification of Recombinant Poly(ADP-Ribose) Polymerases

Jean-Christophe Amé, Thomas Kalisch, Françoise Dantzer,
and Valérie Schreiber

Abstract

The purification of Poly(ADP-ribose) polymerases from overexpressing cells (Sf9 insect cells, *Escherichia coli*) has been updated to a fast and reproducible three chromatographic steps protocol. After cell lysis, proteins from the crude extract are separated on a Heparine Sepharose™ column. The PARP-containing fractions are then affinity purified on a 3-aminobenzamide Sepharose™ chromatographic step. The last contaminants and the 3-methoxybenzamide used to elute the PARP from the previous affinity column are removed on the high-performance strong cations exchanger Source™ 15S matrix. The columns connected to an ÄKTA™ purifier system allow the purification of PARPs in 3 days with a high-yield recovery. As described in the protocol, more than 11 mg of pure and highly active mouse PARP-2 can be obtained from 1 L of Sf9 insect cell culture.

Key words: Poly(ADP-ribose) polymerase, PARP inhibitors, PARP purification, Affinity chromatography

1. Introduction

Since a few years, PARP inhibition has been successfully employed as a novel therapeutic strategy to enhance the cytotoxic effects of DNA-damaging agents. PARP inhibition has substantial single agent antitumor activity with a wide therapeutic index in homologous DNA repair-defective tumors, such as those arising in BRCA1 and BRCA2 mutation carriers (1, 2) or in “triple negative” breast cancers (3). This is the first successful clinical application of a synthetic lethal approach to targeting cancer. Several PARP inhibitors are now in clinical development that inhibits the PARPs in various degrees but with a higher affinity for PARP-1 and PARP-2 (4). In the future, the design of new inhibitors targeting only a specific PARP

requires that pure and high amount of this enzyme is easily available for enzymatic inhibition evaluation and crystallographic studies.

The following protocol is an up-to-date of the protocol that has been used for the purification of human or mouse recombinant PARP-1, PARP-2, and PARP-3, or their catalytic domains, either overexpressed in Sf9 insect cells or in bacteria (5–7). This system results in a high-level protein production, with three purification steps to obtain high-purity protein that can be used for activity assays or crystallographic studies (8). This protocol can easily be adapted to other expression systems, and for the purification of other PARPs that are sensitive to the inhibitor used. The technique is illustrated by the purification of mouse PARP-2 produced in Sf9 cells.

2. Materials

2.1. Materials for Purification of PARPs

1. All the solutions are prepared using Milli-Q (18.2 MΩ cm at 25°C, 4 ppb TOC) water purified with a Millipore Advantage A10 water purification system connected to a source of reverse osmosis water.
2. XK 16/20, XK 26/100 columns and accessories, Heparine Sepharose™ 6 Fast Flow, ECH Sepharose™ 4B, and Source™ 15S strong cations exchanger are from GE Healthcare.
3. The purification procedures are performed using an ÄKTA™ purifier system controlled by the UNICORN™ 5.10 (or above) control software equipped with either a 10 mL or a 150 mL Superloop™ and a Frac-920 fractions collector from GE-Healthcare. The Superloop™ is filled using a peristaltic pump P-1 from GE-Healthcare.
4. The PARP inhibitors 3-aminobenzamide (3-AB) and 3-methoxybenzamide, the condensing reagent *N'*-(3-Dimethylaminopropyl)-*N*-ethylcarbodiimide hydrochloride, and phenylmethanesulfonyl fluoride (PMSF) are from Sigma-Aldrich. The PARP inhibitors are dissolved in 1 mL methanol, the condensing reagent is dissolve in water. 100 mM stock solution of PMSF is prepared in ethanol.
5. 3-AB Sepharose synthesis wash solutions : Prepare 250 mL of 0.1 M acetate buffer pH 4.0 containing 0.5 M NaCl and 250 mL of 0.1 M Tris–HCl buffer pH 8 containing 0.5 M NaCl.
6. Cell lysis buffer: Prepare 250 mL of 25 mM Tris–HCl pH 8.0 buffer containing 50 mM glucose, 10 mM EDTA, 1 mM PMSF, and two proteases inhibitor cocktail tablets (CØmplete Mini, Roche Diagnostic GmbH). Store it at 4°C.
7. Detergents: 100% Tween 20; 100% NP-40.
8. NaCl in powder.

9. Protamine sulfate 10 mg/mL in water (Sigma-Aldrich).
10. Proteases inhibitor cocktail tablets (CØmplete Mini, Roche Diagnostic GmbH).
11. Crude protein sample obtained after cell lysis is filtered through a 0.22 µm filter (50 mL disposable vacuum filtration system, Steriflip®, Millipore).
12. A-buffer: 100 mM Tris-HCl pH 7.5, 14 mM β-mercaptoethanol, 0.5 mM EDTA, and 0.5 mM PMSEF.
13. B-buffer: A-buffer containing 1 M NaCl.
14. C-buffer: Affinity chromatography elution buffer (200 mL): A-buffer containing 400 mM NaCl, 0.5 mM 3-methoxybenzamide freshly diluted in 1 mL of methanol (see Note 1).

2.2. Materials for SDS-PAGE

1. Separating buffer (4×): 1.5 M Tris-HCl, pH 8.8, 0.4% SDS. Store at 4°C.
2. Stacking buffer (4×): 0.5 M Tris-HCl, pH 6.8, 0.4% SDS. Store at 4°C.
3. Forty percent acrylamide/bis solution (37.5:1 with 2.6%) (Bio-Rad) and *N,N,N,N'*-Tetramethylethylenediamine (TEMED, Euromedex) Store at 4°C.
4. Ammonium persulfate (Merck): Prepare 10% solution in water and freeze in aliquots at -20°C.
5. Water-saturated isobutanol. Shake equal volumes of water and isobutanol in a glass bottle and allow to separate. Use the top layer of isobutanol. Store at room temperature.
6. Running buffer (5×): Tris-base 30 g/L, glycine 144 g/L, SDS 5 g/L. The pH is not adjusted. Store at room temperature.
7. Prestained molecular weight markers (All blue Precision Plus Protein Prestained Standards, Bio-Rad).
8. Sample buffer: 50 mM Tris-HCl pH 6.8, urea 6 M, SDS 3%, β-mercaptoethanol 6%. Add 3 mg of bromophenol blue in 100 mL of sample buffer. Aliquot and store at -20°C.
9. Coomassie blue staining solution: Prepare 250 mL of 0.3% (w/v) Coomassie blue (Sigma-Aldrich) in 50% methanol, 10% acetic acid.
10. Coomassie blue destaining solution: Prepare 1 L of 50% methanol, 10% acetic acid in water.

2.3. Materials for Western Blot

1. Stock transfer buffer (10×): Tris-base 30 g/L, glycine 144 g/L, SDS 10 g/L. The pH is not adjusted but should be 8.3. Store at room temperature.
2. Transfer buffer (1×): For a 1-L solution, mix in the following order 100 mL of 10× stock transfer buffer, 700 mL of water, and 200 mL of 95% ethanol.

3. Nitrocellulose membrane Schleicher & Schuell Protan BA 83, 0.2 μm porosity (Whatman GmbH), Whatman 3MM filter papers.
4. TBS buffer (10 \times): Tris-base 60.5 g/L pH 8.0 adjusted with 37% HCl, NaCl 87.66 g/L.
5. TBS-Tween buffer (1 \times): In a cylinder to make a 1-L solution, dilute 100 mL of 10 \times TBS buffer, 3 mL of Tween-20, and complete with water.
6. Anti-PARP-1 rabbit polyclonal antibody (Alexis Biochemicals), anti-PARP-2 rabbit polyclonal antibody (Alexis Biochemicals).
7. Horseradish peroxidase (HRP)-conjugated goat anti-rabbit secondary antibody (Sigma-Aldrich).
8. Blocking buffer: 5% (w/v) nonfat dry milk in TBS-Tween.
9. Enhanced chemiluminescent reagents, ECL Plus Western Blotting Detection System, Amersham, GE Healthcare and BioMax MR film (Kodak) or Amersham Hyperfilm™ ECL (GE Healthcare).

2.4. Materials for Detection of PARP Activity in Solution

1. 5 mL-glass assay tubes, 25 mm diameter Whatman Glass Microfibre Filters (Whatman International Ltd.) or equivalent, a 25-mm diameter vacuum filtration unit.
2. Liquid scintillation counter, high flash point LSC-cocktail aqueous and nonaqueous samples, Ultima Gold MV-Packard (Packard BioSciences BV).
3. Precipitation buffer: 5% (w/v) TCA (Merk KGaA) and 1% (w/v) inorganic phosphate (Merk KGaA) solution dissolved in water. Keep on ice.
4. Washing buffer: Ethanol 95% (v/v). Keep on ice.
5. Purified PARP-1 (Alexis Biochemicals).
6. DNase I-treated DNA (Alexis Biochemicals).
7. PARP activity incubation mixture (10 \times): 500 mM Tris-HCl pH 8, 40 mM MgCl_2 , 1.5 M NaCl, 10 mM DTT, 5 μg (60 pmol) DNase I treated DNA, 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ BSA, 4 mM NAD, 1 μCi [^{32}P]-NAD $^+$ (800 Ci/mmol, 5 $\mu\text{Ci}/\mu\text{L}$, Perkin Elmer).

3. Methods

3.1. Purification Protocol Overview

A schematic representation of the purification protocol of the PARPs is presented Fig. 1. It summarizes the various steps needed to obtain a fairly pure and active protein from a cell culture (Sf9, *Escherichia coli*) overexpressing the PARP of interest.

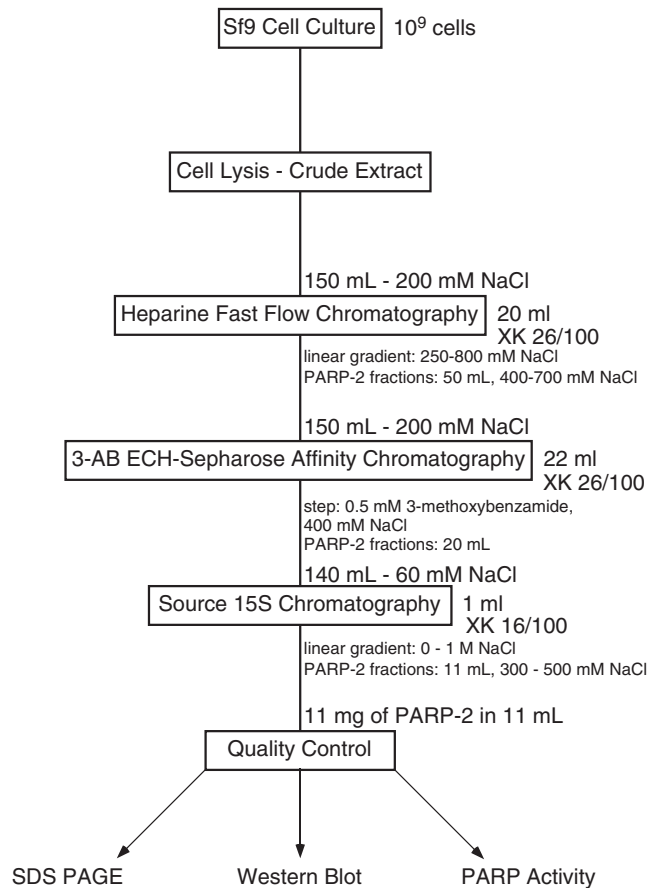


Fig. 1. Schematic representation of the purification protocol of PARPs.

3.2. UNICORN™ Methods Controlling the ÄKTA™ Purifier System

The UNICORN™ control software enables real-time control of the ÄKTA™ purifier system. It makes a very convenient interface to use this purification system.

UNICORN control system functions include:

1. Real-time flow scheme
2. Trend curve data
3. Display of all monitor values
4. Method Logbook for full documentation
5. Method start protocol
6. Note books for prerun, run, and postrun notes
7. Method handling with full flexibility

Here, we do not detail the various aspect of the software; please refer to the official documentation that comes with both the ÄKTA™ and the UNICORN™ systems.

However, to facilitate the use of our purification protocol, we have included the UNICORN™ methods we have developed that

suit our needs. Of course, the reader is free to adapt these methods to his own needs and convenience. The methods that are described in more details later (Subheadings 3.6–3.8) are shown on Fig. 2.

The methods are entered using the methods editor provided with the software and saved in the user directory. A method is started by opening in the control window the corresponding file and by pressing the RUN button.

3.3. 3-AB ECH-Sepharose™ 4B Column Synthesis

ECH Sepharose™ 4B is formed by covalent linkage of 6-amino-hexanoic acid to Sepharose 4B using an epoxy coupling method. ECH Sepharose 4B has free carboxyl groups at the end of 9-atom spacer arms, which are used to couple ligands containing primary amino groups with the carbodiimide coupling method (see Note 2).

3.3.1. Preparing the Matrix

ECH Sepharose™ 4B is supplied preswollen in 20% ethanol. Decant the ethanol solution and wash the required amount of matrix on a sintered glass filter (porosity G3) with distilled water adjusted to pH 4.5 with HCl, followed by 0.5 M NaCl (80 mL in aliquots/mL sedimented matrix). The matrix is then washed in water and kept in water in a 50-mL Falcon tube.

3.3.2. 3-AB Coupling Reaction

The method for coupling is the carbodiimide method. The *N,N'*-disubstituted carbodiimide promotes condensation between the amino of the 3-AB and a free carboxyl group to form a peptide link by acid-catalyzed removal of water.

3.3.3. 3-AB Coupling Procedure

1. Dissolve 0.5 g of 3-AB in 1 mL of methanol.
2. Add the 3-AB solution to 25 mL of matrix.
3. 1 g of *N'*-(3-dimethylaminopropyl)-*N*-ethylcarbodiimide hydrochloride (Sigma-Aldrich) is dissolved in water, then, added to the matrix suspension. Adjust the pH to 4.5. Complete the final volume to 50 mL with water. Rotate the mixture in a cold room. Do not use magnetic stirrers as they may disrupt the Sepharose matrix.
4. Adjust the pH of the reaction mixture (RM) during the first hour (pH will decrease) by adding drops of 0.1 M sodium hydroxide. Incubate overnight under rotation in the cold room.
5. Remove the excess of uncoupled ligand that remains after coupling by washing the product thoroughly with at least three cycles of alternating pH. Each cycle should consist of a wash with 0.1 M acetate buffer pH 4.0 containing 0.5 M NaCl followed by a wash with 0.1 M Tris buffer pH 8 containing 0.5 M NaCl.
6. Finally, wash the matrix with distilled water. The matrix is light sensitive and should be protected from light. The matrix is then packed in a suitable column compatible for use with the ÄKTA™ purifier system (GE Healthcare).

```

Heparine method
UNICORN 5.10 (Build 405)
User: jc 18/05/2010 09:34:09Paris, Madrid (heure d'été)
Method file: c:\...\jc\HeparineFastFlow20mlGrandeLoop

Main method:
----- Block : Main -----
0.00 Base Volume
0.00 Wavelength 280 {nm}, 254 {nm}, 230 {nm}
0.00 AveragingTimeUV 2.56 {sec}
0.00 Alarm_Pressure Enabled, 0.60 {MPa}, 0.00 {MPa}
0.00 Gradient 20 {%B}, 0.00 {base}
0.00 Flow 1.000 {ml/min}
25.00 AutoZeroUV
25.00 Message "préparer l'injection", Screen, "submarine"
25.00 Flow 1.00 {ml/min}
25.00 InjectionValve Inject
35.00 Fractionation_900 10.000 {ml}
180.00 InjectionValve Load
180.00 Flow 1.000 {ml/min}
180.00 Fractionation_900 10.000 {ml}
180.00 Gradient 25 {%B}, 0.00 {base}
210.00 Gradient 80 {%B}, 100 {base}
310.00 Gradient 100 {%B}, 0 {base}
335.00 Gradient 0 {%B}, 0.00 {base}
360.00 Fractionation_Stop_900

3-AB method
UNICORN 5.10 (Build 405)
User: jc 18/05/2010 09:35:11Paris, Madrid (heure d'été)
Method file: c:\...\jc\mPARP2bVolCol22mlReduite

Main method:
----- Block : Main -----
0.00 Base Volume
0.00 Wavelength 280 {nm}, 254 {nm}, 230 {nm}
0.00 AveragingTimeUV 2.56 {sec}
0.00 Alarm_Pressure Enabled, 1.00 {MPa}, 0.00 {MPa}
0.00 Gradient 10 {%B}, 0.00 {base}
0.00 Flow 1.00 {ml/min}
25.00 AutoZeroUV
25.00 Message "préparer l'injection", Screen, "submarine"
25.00 Flow 1.000 {ml/min}
25.00 InjectionValve Inject
40.00 Fractionation_900 10.000 {ml}
180.00 InjectionValve Load
180.00 Flow 1.000 {ml/min}
180.00 Fractionation_900 10 {ml}
180.00 Gradient 10.0 {%B}, 0.00 {base}
200.00 Gradient 40 {%B}, 0 {base}
240.00 Pause INFINITE {Minutes}
240.00 Gradient 0 {%B}, 0.00 {base}
300.00 Fractionation_Stop_900

Source 15S method
UNICORN 5.10 (Build 405)
User: jc 18/05/2010 09:32:47Paris, Madrid (heure d'été)
Method file: c:\...\jc\RessourceSmPARP2MethodJC

Main method:
----- Block : Main -----
0.00 Base Volume
0.00 Wavelength 280 {nm}, 254 {nm}, 230 {nm}
0.00 AveragingTimeUV 2.56 {sec}
0.00 Alarm_Pressure Enabled, 1.5 {MPa}, 0.00 {MPa}
0.00 Gradient 0.0 {%B}, 0.00 {base}
0.00 Flow 2.00 {ml/min}
10 AutoZeroUV
10.00 Message "préparer l'injection", Screen, "submarine"
10.00 Hold
10.00 InjectionValve Inject
10.00 Flow 2.00 {ml/min}
10.00 Fractionation_900 10 {ml}
150.00 InjectionValve Load
150.00 Flow 1.000 {ml/min}
150.00 Gradient 0 {%B},0 {base}
150.00 Fractionation_900 2.5 {ml}
155.00 Gradient 100 {%B}, 60 {base}
155.00 Fractionation_900 2.500 {ml}
215.00 Gradient 100 {%B}, 0 {base}
225.00 Gradient 0 {%B}, 0.00 {base}
225.00 Fractionation_Stop_900
235.00 Gradient 0.0 {%B}, 0.00 {base}

```

Fig. 2. UNICORN™ methods programming the purification steps using the ÄKTA™ purifier system.

3.4. Packing Sepharose

The following procedure is suitable for the Heparine Sepharose™ 6 Fast Flow matrix, the ECH Sepharose™ 4B matrix and the Source™ 15S matrix. Prepare slurry with binding buffer (A-buffer) in a ratio of 75% settled medium to 25% buffer (see Note 3).

1. Equilibrate all material to the temperature at which the chromatography is performed.
2. De-gas the medium slurry.
3. Eliminate air from the column dead spaces by flushing the end pieces with buffer (see Note 4). Close the column outlet with a few centimeters of buffer remaining in the column.
4. Pour the slurry into the column in one continuous motion. Pouring the slurry down a glass rod held against the wall of the column minimizes the introduction of air bubbles.
5. Immediately fill the remainder of the column with buffer, mount the column top piece onto the column and connect the column to a pump like the peristaltic pump P-1 from GE-Healthcare.
6. Open the bottom outlet of the column and set the pump to run at the desired flow rate. This should be at least 133% of the flow rate to be used during subsequent chromatographic procedures. However, the maximum flow rate is typically employed during packing (see Note 5).
7. Maintain the packing flow rate for 3 bed volumes after a constant bed height is reached.

3.5. Cell Lysate Preparation (Insect Cells, *E. coli*)

The following protocol is suitable for purification of the human recombinant PARP-1, -2 and -3 overexpressed in Sf9 insect cells. This system results in a high-level protein expression. Three purification steps are necessary to obtain high-purity protein that can be used for activity assays or even crystallographic studies. As an example, here we present the purification of the mouse PARP-2 (see Note 6).

All the steps are performed at 4°C ideally in the cold room or on ice.

1. Following the expression of the protein, the cells (Sf9) are harvested by centrifugation ($2,500 \times g$, 5 min at room temperature), washed three times in PBS 1× and dry frozen at -80°C . The cells are then quickly defrosted and resuspended in 5 mL *per* 10^8 cells of cold cell lysis buffer.
2. Add 0.2% of Tween 20, 0.2% of NP40, 1 M NaCl (weigh the necessary amount) final. For 10^9 cells, the final volume should be 50 mL.
3. Gently agitate the cell suspension for 20 min on a rotating wheel in the cold room. Transfer to a cold glass container.

4. Moderately sonicate 4×20 s in ice. Do not stop agitating during the sonication process to ensure a good lysis. The viscosity of the solution should disappear.
5. Clear lysate from cellular debris by centrifugation at $50,000 \times g$ for 45 min at 4°C in polycarbonate tubes (rotor Ti70 Beckman) or at $9,400 \times g$ for 60 min at 4°C in 50-mL Falcon tubes (rotor JA12 Beckman).
6. Add to the supernatant 1 mg/mL final of a 10 mg/mL protamine sulfate solution in water to precipitate the nucleic acids. Centrifuge at $50,000 \times g$ for 20 min at 4°C in polycarbonate tubes (rotor Ti70 Beckman) or at $9,400 \times g$ for 30 min at 4°C in 50-mL Falcon tubes (rotor JA12 Beckman).
7. The crude protein solution is clarified by filtration through a $0.22 \mu\text{m}$ vacuum filter (Steriflip®).
8. The protein solution is then diluted with A-Buffer to final concentration of 200 mM NaCl (see Note 7).

3.6. Heparine Sephacrose™ 6 Fast Flow Chromatography

The column provides fast, preparative separations of proteins based on their affinity for heparin. Heparin is a naturally occurring glycosaminoglycan, which is an effective affinity binding and ion exchange ligand for a wide range of biomolecules, including DNA-binding proteins, coagulation factors and other plasma proteins, lipoproteins, protein synthesis factors, enzymes that act on nucleic acids, and steroid receptors. Based on these specific properties we included a Heparine pseudo-affinity chromatography step as a first step to purify PARP-1 and PARP-2. It should also work for PARP-3 as this protein has been reported to be activated by DNA (6). This chromatographic step has many advantages to differential ammonium sulfate precipitation that we used to perform before (7). It is fast, automated because of the use the ÄKTA™ purifier system, and most important, has a very high recovery of active PARP-2 with a strong binding to the Heparine Sepharose™ matrix. Less than 10% of the total cellular proteins are retained on the column and among them the PARPs represent more than 50%.

Here, we describe the automated operation step-by-step followed by the ÄKTA™ purifier system using the Heparine Method as shown in Fig. 3. All the steps of the purification are performed in the cold room at 4°C .

1. Equilibrate the column with 3 bed volumes of 20% B-buffer (200 mM NaCl).
2. The 150-mL Superloop is filled with the diluted protein solution obtained from the SF9 cell lysis in the previous step using a peristaltic pump (P-1, GE-Healthcare).
3. The Heparine Sepharose™ column is loaded at a flow rate of 1 mL/min. 10-mL fractions are collected for further analysis.

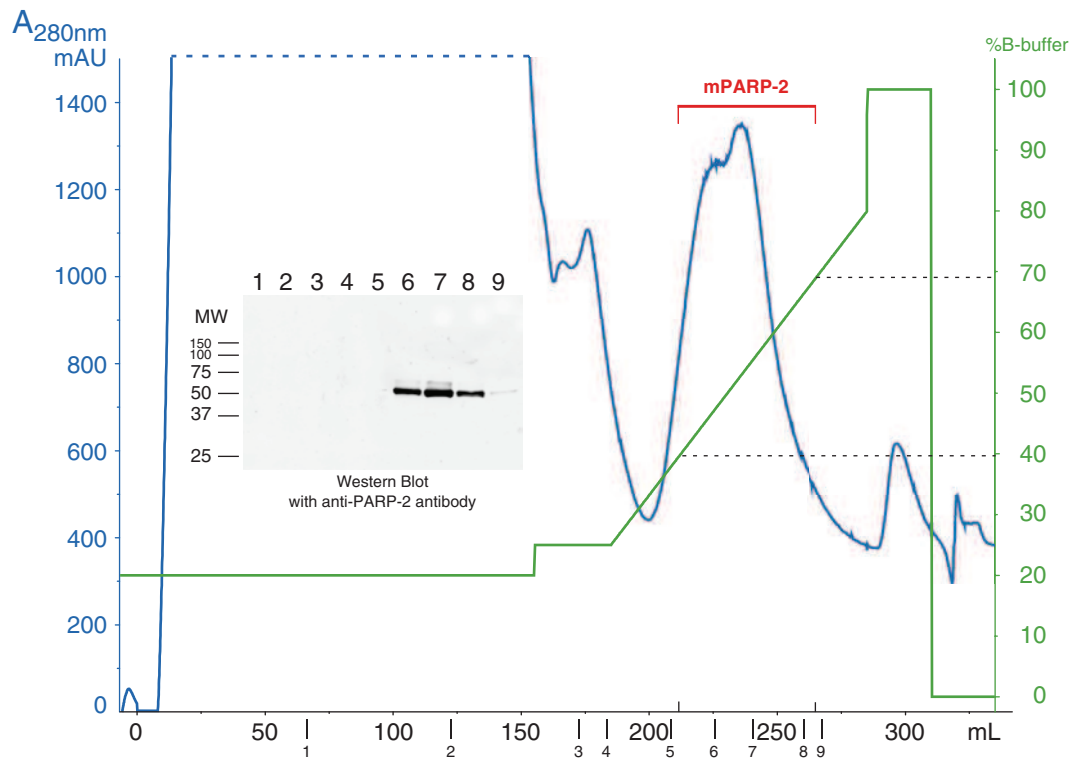


Fig. 3. Elution profile of proteins from the Heparine Sepharose™ 6 Fast Flow column. *Sample*: 150 mL of crude cell extract is obtained from the lysis of 10^9 Sf9 cells overexpressing PARP-2 cloned in a baculovirus and diluted with A-buffer to 200 mM NaCl; *column*: 20 mL Heparine Sepharose™ 6 Fast Flow packed in an XK 26/100 column; *flow rate*: 1 mL/min; *binding buffer*: 20% B-buffer (200 mM NaCl); *elution buffer*: B-buffer (1 M NaCl); *operation*: (1) equilibration: 60 mL 20% B-buffer (200 mM NaCl); (2) sample application (150 mL loaded in a 150 mL-Superloop); (3) wash: 30 mL, 25% B-buffer (250 mM NaCl); (4) elution: (a) linear gradient, 25–80% B-buffer in 100 mL, (b) step, 100% B-buffer in 25 mL, (c) wash, 0% B-buffer in 25 mL.

4. The column is washed with 30 mL of 25% B-buffer (250 mM NaCl).
5. PARP-2 is eluted using a linear gradient, 25–80% B-buffer between 400 and 700 mM NaCl. As control, an aliquot of each fraction is analyzed by SDS-PAGE and Coomassie blue staining. Fractions containing high amount of PARP-2 are pooled (50 mL) and diluted with A-buffer to lower NaCl concentration to 200 mM.
6. An additional 25 mL elution step at 1 M NaCl is added to remove all proteins bound to the column.
7. The column is regenerated by washing with 25 mL of A-buffer and stored for months at 4°C in water containing 20% ethanol.

3.7. 3-AB ECH-Sepharose™ Affinity Chromatography

The poly (ADP-ribose) polymerases (PARP-1, PARP-2, and PARP-3) specifically interact with inhibitors derived from the nicotinamide moiety of the NAD⁺. This chromatographic step is based upon the

high affinity of the PARPs for a ligand, the 3-AB (a low-affinity inhibitor for PARP-1, -2, and -3) coupled to a Sepharose™ matrix. Following the binding of PARPs to the 3-AB matrix, the column is washed at high salt concentration to eliminate unspecific interactants. Elution is based upon the competition between the immobilized 3-AB-matrix and another circulating PARP inhibitor (3-methoxybenzamide) present in high concentration in the elution buffer and with the PARPs (see Note 8).

3-AB ECH-Sepharose™ (prepared as in Subheading 3.3) is packed in an XK 26/100 column connected to the ÄKTA™ purifier system. The bed volume of this column is 22 mL. The maximum working flow rate is 1 mL/min (see Note 9).

1. Equilibrate the column with 3 bed volumes of 10% A-buffer (100 mM NaCl).
2. The 150 mL Superloop is filled with the pooled fractions eluted and diluted to 200 mM NaCl from the Heparine Sepharose™ column in the previous step using a peristaltic pump (P-1, GE-Healthcare).
3. The 3-AB ECH-Sepharose™ column is loaded at a flow rate of 1 mL/min. 10-mL fractions are collected for further analysis.
4. The column is washed with 20 mL of 10% B-buffer (100 mM NaCl).
5. The column is then washed with 40 mL of 40% B-buffer (400 mM NaCl) to elute all proteins that are not specifically bound to the column.
6. After this step, the ÄKTA™ purifier is automatically put on hold (240 pause INFINITE (minute)) to be able to change the A-buffer bottle with the eluting C-buffer. Then, press the “Continue” button on the UNICORN™ program control window to resume purification.
7. PARP-2 is eluted with 60 mL of 100% C-buffer containing 400 mM NaCl and 0.5 mM of the competitor PARP inhibitor 3-methoxybenzamide. PARP-2 is eluted in one bed volume (≈ 20 mL) of the column as shown in the protein gel (lanes 4 and 5) included with the elution profile (Fig. 4).
8. The column is regenerated by washing with 2 bed volumes of 100% B-buffer (1 M NaCl) and 3 bed volumes of 0% B-buffer (without NaCl). The column is stored for months at 4°C in the dark in water containing 20% ethanol.

3.8. Source™ 15S Chromatography

SOURCE 15S are strong anion and cation exchange media based on polystyrene/divinyl benzene monodisperse beads of 15 μm diameter used for difficult applications, to separate very similar molecules and trace contaminants (see Note 10).

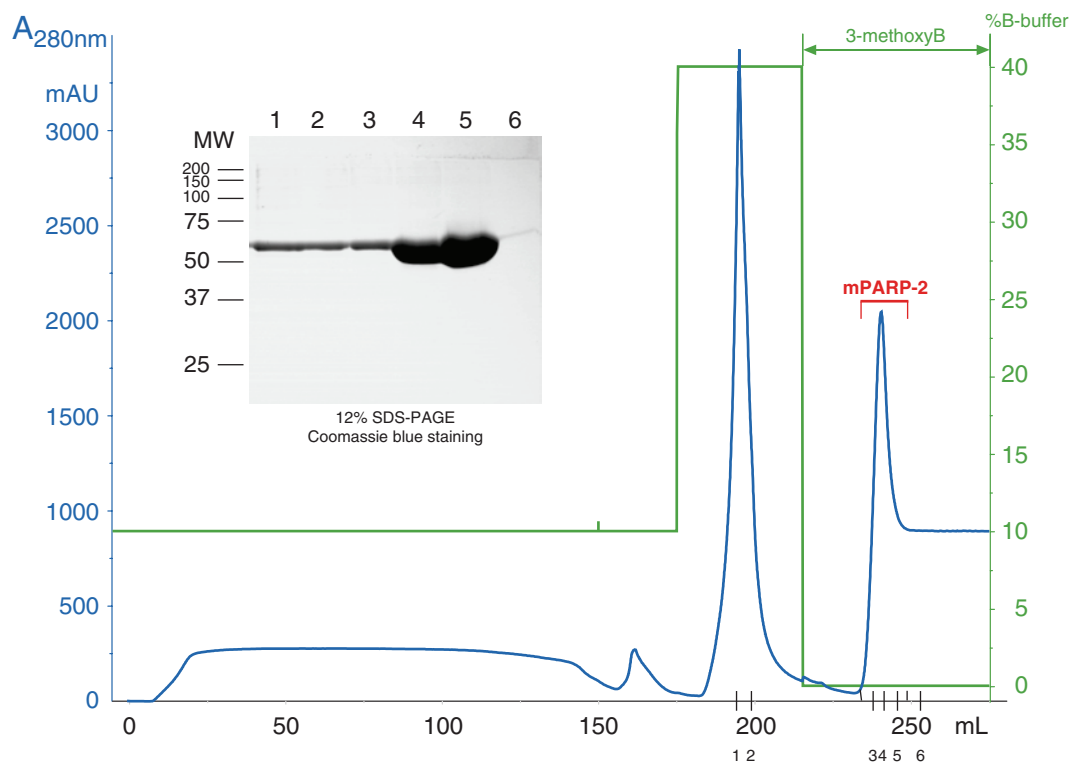


Fig. 4. Elution profile of proteins from the 3-aminobenzamide ECH-Sepharose™ 4B column. *Sample*: 50 mL Heparine Sepharose™ 6 Fast Flow eluted fractions containing PARP-2 (eluted between 400 and 700 mM NaCl) diluted (1/3 dilution) with A-buffer to 200 mM NaCl; *column*: 22 mL 3-aminobenzamide ECH-Sepharose™ packed in an XK 26/100 column; *flow rate*: 1 mL/min; *binding buffer*: 10% B-buffer (100 mM NaCl); *wash buffer*: 40% B-buffer (400 mM NaCl); *operation*: (1) equilibration: 60 mL 10% B-buffer (100 mM NaCl); (2) sample application (150 mL loaded in a 150 mL-Superloop); (3) wash: 20 mL A-buffer with 10% B-buffer (100 mM NaCl); (4) elution: (a) step, 40% B-buffer (400 mM NaCl) in 40 mL, (b) step, 100% C-buffer (A-buffer containing 400 mM NaCl and 0.5 mM 3-methoxybenzamide) in 60 mL. *12% SDS-PAGE inset*: 20 μ L (0.2%) of the indicated fractions (10 mL) were loaded on a 12% SDS-PAGE and stained by Coomassie blue staining. Fractions 3 and 4 were pooled and diluted by adding 120 mL of A-buffer to lower the concentration of NaCl to 60 mM, then loaded on the next column.

We now describe the automated operation step by step followed by the ÄKTA™ purifier system using the Source 15S Method as shown in Fig. 5.

1. Equilibrate the column with 10 bed volumes (10 mL) of 0% B-buffer (0 mM NaCl), flow rate at 2 mL/min.
2. The eluted PARP-2 from 3-AB ECH-Sepharose™ is diluted with A-buffer to \approx 60 mM NaCl.
3. The 150 mL Superloop is filled with the diluted PARP-2 solution obtained from the 3-AB ECH-Sepharose™ column in the previous step using a peristaltic pump (P-1, GE-Healthcare).
4. The Source™ 15S column is loaded at a flow rate of 2 mL/min. 10-mL fractions are collected for further analysis.

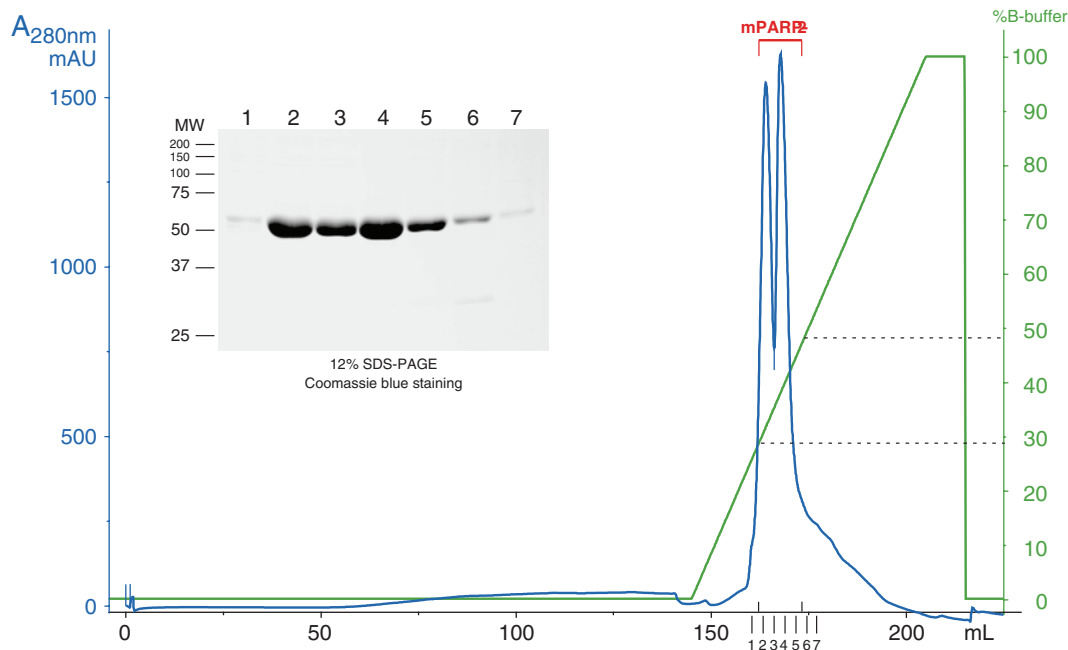


Fig. 5. Elution profile of proteins from the Source™ 15S column. *Sample*: 20 mL 3-aminobenzamide ECH-Sepharose™ eluted fractions containing PARP-2 (eluted with C-buffer) diluted (1/7 dilution) with A-buffer to 60 mM NaCl; *Column*: 1 mL Source™ 15S packed in an XK 16/100 column; *flow rate*: 1 mL/min (load and wash at 2 mL/min); *binding buffer*: 0% B-buffer (0 mM NaCl); *wash buffer*: 0% B-buffer (0 mM NaCl); *operation*: (1) equilibration: 10 mL 0% B-buffer (0 mM NaCl); (2) sample application (140 mL loaded in a 150 mL-Superloop); (3) wash: 5 mL A-buffer with 0% B-buffer (0 mM NaCl); (4) elution: (a) linear gradient, 0–100% B-buffer in 60 mL, (b) step, 100% B-buffer in 10 mL, (c) wash, 0% B-buffer in 10 mL. *12% SDS-PAGE inset*: 10 μ L (0.4%) of the indicated fractions (2.5 mL) were loaded on a 12% SDS-PAGE and stained by Coomassie blue staining. Fractions 2, 3, 4, and 5 were pooled and 20% glycerol was added. The concentration and the total amount of protein was calculated using the molar extension coefficient of mouse PARP-2 ($\epsilon_{280\text{ nm}} = 58,460 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) using the *Beer-Lambert law*, $A = \epsilon \cdot c \cdot l$. 11 mg of highly purified mouse PARP-2 was obtained starting from 10^9 Sf9 cells infected with an mPARP-2 recombinant baculovirus in a 1 L-culture.

5. The column is washed with 5 mL of 0% B-buffer (0 mM NaCl). 2.5-mL fractions are now collected and the flow rate is set to 1 mL/min.
6. PARP-2 is eluted using a linear gradient, 0–100% B-buffer between 0 and 1 M NaCl. PARP-2 is eluted in the fractions between 300 and 500 mM NaCl as shown on the protein gel insert (lanes 2–6) in Fig. 5.
7. An additional 10-mL washing step at 1 M NaCl is added to remove all proteins bound to the column.
8. The column is regenerated by washing with 10 mL of 0% B-buffer and stored for months at 4°C in water containing 20% ethanol.

3.9. Quality Control: SDS-PAGE

1. The following instructions assume the use of a 11 by 10 cm gel system. They are easily adaptable to other formats. It is important that the glass plates are cleaned before use with a soft

detergent (Teepol) and rinsed extensively with distilled water then 95% ethanol and air-dried.

2. Prepare a 1-mm thick, 10% gel by mixing 5 mL water with 2.5 mL of 4× separating buffer, 2.5 mL acrylamide/*bis* solution, 68 μL ammonium persulfate solution, and 14 μL TEMED. Pour the gel, leaving space for a stacking gel, and carefully overlay with water-saturated isobutanol. The gel should polymerize in about 10–15 min.
3. Pour off the isobutanol and rinse the top of the gel twice with water.
4. Prepare the stacking gel by mixing 3.2 mL water with 1.25 mL of 4× stacking buffer, 500 μL acrylamide/*bis* solution, 40 μL ammonium persulfate solution, and 8 μL TEMED. Pour the stack and insert the comb. The stacking gel should polymerize in about 10 min.
5. Prepare the running buffer by mixing 200 mL of the 5× running buffer with 800 mL of water.
6. After polymerization of the stacking gel, the comb is carefully removed and the wells are washed with 1× running buffer using a 3-mL syringe fitted with a 22-gauge needle.
7. Add the running buffer to the lower chamber first, (avoid any bubbles which could be trapped between the glass plates on the bottom of the gel), then to the upper gel unit and load the 10–25 μL of each sample in a well. Include one well for prestained molecular weight markers.
8. Complete the assembly of gel unit and connect the power supply. The gel is run at 12 V/cm for 90 min at room temperature or until the dye front reaches the bottom of the gel.
9. Coomassie blue staining of the proteins separated by SDS-PAGE is performed by incubating the gel 1 h in the Coomassie blue staining solution under shaking at room temperature. The proteins are revealed by destaining by washing the gel under shaking in the Coomassie blue destaining solution. When this solution becomes blue, it must be replaced by a fresh one. This must be repeated until a gel with a clear background is obtained.

3.10. Quality Control: Western Blot

1. The samples that have been separated by SDS-PAGE are transferred to nitrocellulose membranes electrophoretically. Any transfer tank system can be used for this purpose. We use routinely a Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell from Bio-Rad.
2. Prepare a tray of transfer buffer that is large enough to lay out a transfer cassette with its pieces of Scotch-brite® pads and with two sheets of Whatman® 3MM paper submerged on one side.

Cut a sheet of the nitrocellulose just larger than the size of the gel (separating and stacking), wet and soak in the transfer buffer.

3. Disconnected the gel unit from the power supply and disassemble. Setup the sandwich from bottom to top: one side of the transfer cassette, a piece of Scotch-brite® pad, a sheet of Whatman® 3MM paper, the nitrocellulose membrane, the gel (ensuring that no bubbles are trapped between the membrane and the gel), a sheet of Whatman® 3MM paper, a piece of Scotch-brite® pad. The transfer cassette is then carefully closed.
4. Place the cassette into the transfer tank such that the nitrocellulose membrane is between the gel and the anode (+). Fill up the tank with cold transfer buffer and add a magnetic stir bar. The electrophoretic transfer is performed in a cold chamber (4°C) with the tank placed on top of a magnetic stirrer. Make sure that the magnetic stir bar rotates freely.
5. Put the lid on the tank and activate the power supply. The transfer is accomplished at 90 V (250 mA) for 1.5 h.
6. Once the transfer is complete, take out the cassette of the tank and carefully disassemble, with the top Scotch-brite® pad and sheets of 3MM paper removed. Do not forget to orientate the membrane. The gel can be discarded and the excess nitrocellulose cut off. The colored molecular weight markers should be clearly visible on the membrane.
7. Incubate the nitrocellulose in 20 mL TBS-Tween for 5 min then in 20 mL blocking buffer for 20 min at room temperature on a rocking platform.
8. Discard the blocking buffer and replace by a minimum (10 mL) of blocking buffer containing the anti-PARP-1 antibody at the working dilution (1:4,000), or the anti-PARP-2 antibody at the working dilution (1:4,000). The incubation is performed at room temperature for 2 h or at 4°C overnight on a rocking platform.
9. Remove the primary antibody. The dilution of antibody can be kept for further use and store at -20°C. Wash the membrane three times for 10 min each with 20 mL TBS-Tween.
10. The HRP-conjugated goat anti-rabbit secondary antibody is freshly prepared for each experiment as a 1:20,000-fold dilution in blocking buffer and added to the membrane for 2 h at room temperature on a rocking platform.
11. Discard the secondary antibody and wash the membrane three times for 10 min each with TBS-Tween at room temperature.
12. After removing the excess of buffer, laid the membrane on top of a glass plate. Mix 1 mL of bottle A and 25 µL of bottle B of

ECL Plus reagents and spread evenly on top of the membrane in a dark chamber. After 2–3 min incubation, remove the excess of ECL solution from the blot with Kim-Wipes, then place on a Whatman® 3MM paper and wrap in a piece of Saran Wrap™.

13. Place the blot in an X-ray film cassette with film for a suitable exposure time, typically a few minutes. The film is developed using an automatic film developer X-OMAT (Eastman Kodak). An example of the results produced is shown in Fig. 3.

3.11. Detection of PARP Activity in Solution

1. The reaction should be done in triplicates. In a glass tube, mix 10 µL of PARP activity incubation mixture with 90 µL water.
2. Add 200 ng of PARP-1/-2/-3 and immediately incubate the reaction for 10 min at 25°C.
3. Stop the reaction by adding 4 mL of ice-cold precipitation buffer.
4. Filter the reaction solution with a vacuum filtering system using Whatman Glass Microfibre Filters. The poly(ADP-ribose) will be retained on the filters.
5. Wash the filters twice with 4 mL of ice-cold precipitation buffer and once with ice-cold ethanol 95% (v/v).
6. Air-dry the filters and transfer the filters into scintillation counting vials, add 10 mL of scintillation cocktail, and count the radioactivity in a liquid scintillation analyzer (PerkinElmer Tri-Carb). The radioactivity retained on the filter is the PAR synthesized during the PARP enzymatic reaction.

3.12. Determination of the Specific Activity of PARPs

Usually, the specific activity (SA) of an enzyme (here the PARP-2) is expressed as the amount (in nmol) of substrate (here the NAD⁺) consumed or as the amount of product formed (here the poly(ADP-ribose) or ADP-ribose incorporated) per unit of time (in minute) and per unit of mass (in milligram): $SA_{\text{enzyme}} = \text{nmol}_{\text{enzyme}} / \text{min} / \text{mg}_{\text{enzyme}}$.

To determine PARPs specific activity, it is required to know the relationship between the incorporated radioactivity measured (as in the assay described above Subheading 3.11) and the actual amount of NAD⁺ consumed by the enzyme. It can be estimated by counting the total radioactivity of an aliquot of the reaction mixture and by calculating the relation between dpm and nmol. Practically, take 2 µL of the 100 µL of the radioactive incubation mixture and transfer it onto a Whatman Glass Microfibre Filter, let it air-dry and count it by scintillation counting as above in Subheading 3.11. As an example and for better understanding, here is the determination of the specific activity of PARP-2 purified above (see Table 1 and its legend for calculation details). The same approach is used with the other PARPs.

Table 1
Determination of the specific activity of PARP-2

Sample	dpm measured	nmol of NAD ⁺
2 μL of RM	36,740	0.800
No enzyme T1	853	
No enzyme T2	665	
No enzyme T3	740	
Mean of T1, T2, T3	753	
1 μg PARP-2 S1	256,694	
1 μg PARP-2 S2	197,083	
1 μg PARP-2 S3	209,447	
Mean of S1, S2, S3	221,075	4.813
Mean S – Mean T	220,322	4.797
Specific activity (nM _{NAD⁺} /min/mg _{PARP-2})		239.8

100 μL of PARP activity reaction mix containing 400 μM NAD⁺, 200 ng of DNase I activated DNA, and 0.5 μCi [³²P]-NAD⁺ were incubated with no enzyme or with 1 μg of purified mouse PARP-2 at room temperature for 20 min. The reactions were done in triplicates (T1, T2, T3, and S1, S2, S3). Reactions were stopped by addition of 4 mL of cold precipitation buffer. The TCA precipitated PAR was then vacuum filtered on Whatman Glass Microfibre Filters. The air-dried filters were scintillation counted in a liquid scintillation analyzer. The table shows the results of the measured radioactivity (PAR) retained on the filter in dpm (disintegration per minute). 2 μL of reaction mixture contains

$$\left(\frac{400\mu\text{mol/L NAD}^+}{10^6}\right) \times 2 = 0.800\text{nM NAD}^+ \text{ that correspond to } 36,740 \text{ dpm.}$$

$$1\text{dpm} \Leftrightarrow \frac{0.800\text{nmol}}{36,740\text{dpm}} = 21.77 \times 10^{-6} \text{ nmol NAD}^+ \text{ or equivalent ADP-ribose (ADPR).}$$

$$\text{The specific activity} = \frac{220,322\text{dpm} \times 21.77 \times 10^{-6} \text{ nmol ADPR}}{20\text{min}} \times 1,000 = 239.8 \text{ nmol ADPR/min/mg protein incorporated}$$

4. Notes

1. All the buffers used during the chromatographic steps are degassed and filtered using individual 0.22 μm 500 mL filtration units (Stericup[®] Millipore) to avoid any bubble formation that could interfere with the chromatography itself and with the recording of the absorbance at 280 nm.
2. The long hydrophilic spacer arm makes it particularly suitable for immobilization of small molecules, such as 3-AB.
3. The binding buffer should not contain agents which significantly increase the viscosity.
4. Make sure no air has been trapped under the column net.

5. If you have packed at the maximum linear flow rate, do not exceed 75% of this in subsequent chromatographic procedures.
6. This protocol can easily be adapted to other expression systems.
7. To avoid any protein degradation, this protein solution should not be kept but should be promptly loaded onto the first chromatographic column to start the purification.
8. The technique offers high selectivity, hence high resolution, and high capacity for the protein of interest. Purification is in the order of several thousand-fold and a recovery of active PARP is very high.
9. The column allows the specific binding of more than 30 mg of PARP-1.
10. Even so, the two first purification steps produce already high-purity protein, the advantages introduced by this last chromatographic step are multiple:
 - The high performance of the Source 15S medium should allow the removal of the last contaminants.
 - It replaces favorably the time consuming and cumbersome concentration/dialysis step using Amicon® filtering that could lead to low recovery of the protein because of unspecific binding with the filtration membrane and the apparatus.
 - The purpose of the concentration/dialysis step was also to remove the competitor PARP inhibitor 3-methoxybenzamide used to elute the bound PARPs to the 3-AB column. This new step plays the same role by the dilution/washing/concentration this step introduces.

References

1. O'Brien T, Stokoe D (2009) Converting cancer mutations into therapeutic opportunities. *EMBO Mol Med* 1:297–299
2. Fong PC, Boss DS, Yap TA, Tutt A, Wu P, Mergui-Roelvink M, Mortimer P, Swaisland H, Lau A, O'Connor MJ, Ashworth A, Carmichael J, Kaye SB, Schellens JHM, de Bono JS (2009) Inhibition of poly(ADP-ribose) polymerase in tumors from BRCA mutation carriers. *N Engl J Med* 361:123–134
3. Comen EA, Robson M (2010) Poly(ADP-ribose) polymerase inhibitors in triple-negative breast cancer. *Cancer J* 16:48–52
4. Rouleau M, Patel A, Hendzel MJ, Kaufmann SH, Poirier GG (2010) Parp inhibition: Parp1 and beyond. *Nat Rev Cancer* 10:293–301
5. Amé JC, Rolli V, Schreiber V, Niedergang C, Apiou F, Decker P, Muller S, Höger T, de Murcia JM, de Murcia G (1999) Parp-2, a novel mammalian dna damage-dependent poly(adp-ribose) polymerase. *J Biol Chem* 274:17860–17868
6. Augustin A, Spenlehauer C, Dumond H, de Murcia JM, Piel M, Schmit A-C, Apiou F, Vonesch J-L, Kock M, Bornens M, de Murcia G (2003) PARP-3 localizes preferentially to the daughter centriole and interferes with the G1/S cell cycle progression. *J Cell Sci* 116:1551–1562
7. Giner H, Simonin F, de Murcia G, de Murcia JM (1992) Overproduction and large-scale purification of the human poly(ADP-ribose) polymerase using a baculovirus expression system. *Gene* 114:279–283
8. Oliver AW, Amé J-C, Roe SM, Good V, de Murcia G, Pearl LH (2004) Crystal structure of the catalytic fragment of murine poly(ADP-ribose) polymerase-2. *Nucleic Acids Res* 32:456–464

Bibliographie

- Adamson, B., Smogorzewska, A., Sigoillot, F.D., King, R.W., and Elledge, S.J. (2012). A genome-wide homologous recombination screen identifies the RNA-binding protein RBMX as a component of the DNA-damage response. *Nat Cell Biol* 14, 318-328.
- Aguiar, R.C., Takeyama, K., He, C., Kreinbrink, K., and Shipp, M.A. (2005). B-aggressive lymphoma family proteins have unique domains that modulate transcription and exhibit poly(ADP-ribose) polymerase activity. *The Journal of biological chemistry* 280, 33756-33765.
- Aguiar, R.C., Yakushijin, Y., Kharbanda, S., Salgia, R., Fletcher, J.A., and Shipp, M.A. (2000). BAL is a novel risk-related gene in diffuse large B-cell lymphomas that enhances cellular migration. *Blood* 96, 4328-4334.
- Ahel, D., Horejsi, Z., Wiechens, N., Polo, S.E., Garcia-Wilson, E., Ahel, I., Flynn, H., Skehel, M., West, S.C., Jackson, S.P., *et al.* (2009). Poly(ADP-ribose)-dependent regulation of DNA repair by the chromatin remodeling enzyme ALC1. *Science* 325, 1240-1243.
- Ahel, I., Ahel, D., Matsusaka, T., Clark, A.J., Pines, J., Boulton, S.J., and West, S.C. (2008). Poly(ADP-ribose)-binding zinc finger motifs in DNA repair/checkpoint proteins. *Nature* 451, 81-85.
- Ali, R.G., Bellchambers, H.M., and Arkell, R.M. (2012). Zinc fingers of the cerebellum (Zic): transcription factors and co-factors. *Int J Biochem Cell Biol* 44, 2065-2068.
- Altmeyer, M., Messner, S., Hassa, P.O., Fey, M., and Hottiger, M.O. (2009). Molecular mechanism of poly(ADP-ribosylation) by PARP1 and identification of lysine residues as ADP-ribose acceptor sites. *Nucleic Acids Res* 37, 3723-3738.
- Alvarez-Gonzalez, R., and Althaus, F.R. (1989). Poly(ADP-ribose) catabolism in mammalian cells exposed to DNA-damaging agents. *Mutat Res* 218, 67-74.
- Ame, J.C., Fouquerel, E., Gauthier, L.R., Biard, D., Boussin, F.D., Dantzer, F., de Murcia, G., and Schreiber, V. (2009). Radiation-induced mitotic catastrophe in PARG-deficient cells. *Journal of cell science* 122, 1990-2002.
- Ame, J.C., Rolli, V., Schreiber, V., Niedergang, C., Apiou, F., Decker, P., Muller, S., Hoger, T., Menissier-de Murcia, J., and de Murcia, G. (1999). PARP-2, A novel mammalian DNA damage-dependent poly(ADP-ribose) polymerase. *The Journal of biological chemistry* 274, 17860-17868.
- Ame, J.C., Spenlehauer, C., and de Murcia, G. (2004). The PARP superfamily. *Bioessays* 26, 882-893.
- Andersen, J.S., Lyon, C.E., Fox, A.H., Leung, A.K., Lam, Y.W., Steen, H., Mann, M., and Lamond, A.I. (2002). Directed proteomic analysis of the human nucleolus. *Curr Biol* 12, 1-11.
- Andrabi, S.A., Kim, N.S., Yu, S.W., Wang, H., Koh, D.W., Sasaki, M., Klaus, J.A., Otsuka, T., Zhang, Z., Koehler, R.C., *et al.* (2006). Poly(ADP-ribose) (PAR) polymer is a death signal. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 18308-18313.

- Arabi, A., Wu, S., Ridderstrale, K., Bierhoff, H., Shiue, C., Fatyol, K., Fahlen, S., Hydbring, P., Soderberg, O., Grummt, I., *et al.* (2005). c-Myc associates with ribosomal DNA and activates RNA polymerase I transcription. *Nat Cell Biol* 7, 303-310.
- Atasheva, S., Akhrymuk, M., Frolova, E.I., and Frolov, I. (2012). New PARP gene with an anti-alphavirus function. *J Virol* 86, 8147-8160.
- Audebert, M., Salles, B., and Calsou, P. (2004). Involvement of poly(ADP-ribose) polymerase-1 and XRCC1/DNA ligase III in an alternative route for DNA double-strand breaks rejoining. *The Journal of biological chemistry* 279, 55117-55126.
- Augustin, A., Spenlehauer, C., Dumond, H., Menissier-De Murcia, J., Piel, M., Schmit, A.C., Apiou, F., Vonesch, J.L., Kock, M., Bornens, M., *et al.* (2003). PARP-3 localizes preferentially to the daughter centriole and interferes with the G1/S cell cycle progression. *Journal of cell science* 116, 1551-1562.
- Bai, P., Canto, C., Brunyanszki, A., Huber, A., Szanto, M., Cen, Y., Yamamoto, H., Houten, S.M., Kiss, B., Oudart, H., *et al.* (2011). PARP-2 regulates SIRT1 expression and whole-body energy expenditure. *Cell Metab* 13, 450-460.
- Bai, P., Houten, S.M., Huber, A., Schreiber, V., Watanabe, M., Kiss, B., de Murcia, G., Auwerx, J., and Menissier-de Murcia, J. (2007). Poly(ADP-ribose) polymerase-2 [corrected] controls adipocyte differentiation and adipose tissue function through the regulation of the activity of the retinoid X receptor/peroxisome proliferator-activated receptor-gamma [corrected] heterodimer. *The Journal of biological chemistry* 282, 37738-37746.
- Barkauskaite, E., Jankevicius, G., Ladurner, A.G., Ahel, I., and Timinszky, G. (2013). The recognition and removal of cellular poly(ADP-ribose) signals. *Febs J.*
- Bauersachs, S., Ulbrich, S.E., Gross, K., Schmidt, S.E., Meyer, H.H., Wenigerkind, H., Vermehren, M., Sinowatz, F., Blum, H., and Wolf, E. (2006). Embryo-induced transcriptome changes in bovine endometrium reveal species-specific and common molecular markers of uterine receptivity. *Reproduction* 132, 319-331.
- Belin, S., Beghin, A., Solano-Gonzalez, E., Bezin, L., Brunet-Manquat, S., Textoris, J., Prats, A.C., Mertani, H.C., Dumontet, C., and Diaz, J.J. (2009). Dysregulation of ribosome biogenesis and translational capacity is associated with tumor progression of human breast cancer cells. *PLoS One* 4, e7147.
- Berger, N.A. (1985). Poly(ADP-ribose) in the cellular response to DNA damage. *Radiat Res* 101, 4-15.
- Birch, J.L., Tan, B.C., Panov, K.I., Panova, T.B., Andersen, J.S., Owen-Hughes, T.A., Russell, J., Lee, S.C., and Zomerdijs, J.C. (2009). FACT facilitates chromatin transcription by RNA polymerases I and III. *Embo J* 28, 854-865.
- Blenn, C., Wyrsh, P., Bader, J., Bollhalder, M., and Althaus, F.R. (2011). Poly(ADP-ribose)glycohydrolase is an upstream regulator of Ca²⁺ fluxes in oxidative cell death. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 68, 1455-1466.

- Boamah, E.K., Kotova, E., Garabedian, M., Jarnik, M., and Tulin, A.V. (2012). Poly(ADP-Ribose) polymerase 1 (PARP-1) regulates ribosomal biogenesis in *Drosophila* nucleoli. *PLoS Genet* 8, e1002442.
- Boehler, C., Gauthier, L.R., Mortusewicz, O., Biard, D.S., Saliou, J.M., Bresson, A., Sanglier-Cianferani, S., Smith, S., Schreiber, V., Boussin, F., *et al.* (2011). Poly(ADP-ribose) polymerase 3 (PARP3), a newcomer in cellular response to DNA damage and mitotic progression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, 2783-2788.
- Boisvert, F.M., van Koningsbruggen, S., Navascues, J., and Lamond, A.I. (2007). The multifunctional nucleolus. *Nature reviews Molecular cell biology* 8, 574-585.
- Boisvert, S., Joly, D., and Carpentier, R. (2006). Quantitative analysis of the experimental O-J-I-P chlorophyll fluorescence induction kinetics. Apparent activation energy and origin of each kinetic step. *Febs J* 273, 4770-4777.
- Boulon, S., Westman, B.J., Hutten, S., Boisvert, F.M., and Lamond, A.I. (2010). The nucleolus under stress. *Mol Cell* 40, 216-227.
- Bryant, H.E., Petermann, E., Schultz, N., Jemth, A.S., Loseva, O., Issaeva, N., Johansson, F., Fernandez, S., McGlynn, P., and Helleday, T. (2009). PARP is activated at stalled forks to mediate Mre11-dependent replication restart and recombination. *Embo J* 28, 2601-2615.
- Bryant, H.E., Schultz, N., Thomas, H.D., Parker, K.M., Flower, D., Lopez, E., Kyle, S., Meuth, M., Curtin, N.J., and Helleday, T. (2005). Specific killing of BRCA2-deficient tumours with inhibitors of poly(ADP-ribose) polymerase. *Nature* 434, 913-917.
- Burkart, V., Blaeser, K., and Kolb, H. (1999). Potent beta-cell protection in vitro by an isoquinolinone-derived PARP inhibitor. *Horm Metab Res* 31, 641-644.
- Butler, A.J., and Ordahl, C.P. (1999). Poly(ADP-ribose) polymerase binds with transcription enhancer factor 1 to MCAT1 elements to regulate muscle-specific transcription. *Mol Cell Biol* 19, 296-306.
- Caiafa, P., Guastafierro, T., and Zampieri, M. (2009). Epigenetics: poly(ADP-ribosyl)ation of PARP-1 regulates genomic methylation patterns. *Faseb J* 23, 672-678.
- Caiafa, P., and Zampieri, M. (2005). DNA methylation and chromatin structure: the puzzling CpG islands. *J Cell Biochem* 94, 257-265.
- Calabrese, C.R., Almasy, R., Barton, S., Batey, M.A., Calvert, A.H., Canan-Koch, S., Durkacz, B.W., Hostomsky, Z., Kumpf, R.A., Kyle, S., *et al.* (2004). Anticancer chemosensitization and radiosensitization by the novel poly(ADP-ribose) polymerase-1 inhibitor AG14361. *J Natl Cancer Inst* 96, 56-67.
- Caldecott, K.W. (2007). Mammalian single-strand break repair: mechanisms and links with chromatin. *DNA Repair (Amst)* 6, 443-453.
- Chang, P., Coughlin, M., and Mitchison, T.J. (2005). Tankyrase-1 polymerization of poly(ADP-ribose) is required for spindle structure and function. *Nat Cell Biol* 7, 1133-1139.

- Chang, P., Coughlin, M., and Mitchison, T.J. (2009). Interaction between Poly(ADP-ribose) and NuMA contributes to mitotic spindle pole assembly. *Mol Biol Cell* *20*, 4575-4585.
- Chang, P., Jacobson, M.K., and Mitchison, T.J. (2004). Poly(ADP-ribose) is required for spindle assembly and structure. *Nature* *432*, 645-649.
- Chapman, J.D., Gagne, J.P., Poirier, G.G., and Goodlett, D.R. (2013). Mapping PARP-1 Auto-ADP-ribosylation Sites by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *J Proteome Res.*
- Chapman, J.R., Taylor, M.R., and Boulton, S.J. (2012). Playing the end game: DNA double-strand break repair pathway choice. *Mol Cell* *47*, 497-510.
- Chatton, B., Bahr, A., Acker, J., and Kedinger, C. (1995). Eukaryotic GST fusion vector for the study of protein-protein associations in vivo: application to interaction of ATFa with Jun and Fos. *Biotechniques* *18*, 142-145.
- Chiarugi, A., Dolle, C., Felici, R., and Ziegler, M. (2012). The NAD metabolome--a key determinant of cancer cell biology. *Nat Rev Cancer* *12*, 741-752.
- Cho, S.H., Goenka, S., Henttinen, T., Gudapati, P., Reinikainen, A., Eischen, C.M., Lahesmaa, R., and Boothby, M. (2009). PARP-14, a member of the B aggressive lymphoma family, transduces survival signals in primary B cells. *Blood* *113*, 2416-2425.
- Chou, H.Y., Chou, H.T., and Lee, S.C. (2006). CDK-dependent activation of poly(ADP-ribose) polymerase member 10 (PARP10). *The Journal of biological chemistry* *281*, 15201-15207.
- Cistulli, C., Lavrik, O.I., Prasad, R., Hou, E., and Wilson, S.H. (2004). AP endonuclease and poly(ADP-ribose) polymerase-1 interact with the same base excision repair intermediate. *DNA Repair (Amst)* *3*, 581-591.
- Clark, N.J., Kramer, M., Muthurajan, U.M., and Luger, K. (2012). Alternative modes of binding of poly(ADP-ribose) polymerase 1 to free DNA and nucleosomes. *The Journal of biological chemistry* *287*, 32430-32439.
- Cohausz, O., and Althaus, F.R. (2009). Role of PARP-1 and PARP-2 in the expression of apoptosis-regulating genes in HeLa cells. *Cell Biol Toxicol* *25*, 379-391.
- Cong, R., Das, S., Ugrinova, I., Kumar, S., Mongelard, F., Wong, J., and Bouvet, P. (2012). Interaction of nucleolin with ribosomal RNA genes and its role in RNA polymerase I transcription. *Nucleic Acids Res* *40*, 9441-9454.
- Corona, D.F., and Tamkun, J.W. (2004). Multiple roles for ISWI in transcription, chromosome organization and DNA replication. *Biochim Biophys Acta* *1677*, 113-119.
- Curtin, N.J. (2005). PARP inhibitors for cancer therapy. *Expert Rev Mol Med* *7*, 1-20.
- Curtin, N.J., and Szabo, C. (2013). Therapeutic applications of PARP inhibitors: Anticancer therapy and beyond. *Molecular aspects of medicine.*

D'Amours, D., Desnoyers, S., D'Silva, I., and Poirier, G.G. (1999). Poly(ADP-ribosyl)ation reactions in the regulation of nuclear functions. *Biochem J* 342 (Pt 2), 249-268.

D'Silva, I., Pelletier, J.D., Lagueux, J., D'Amours, D., Chaudhry, M.A., Weinfeld, M., Lees-Miller, S.P., and Poirier, G.G. (1999). Relative affinities of poly(ADP-ribose) polymerase and DNA-dependent protein kinase for DNA strand interruptions. *Biochim Biophys Acta* 1430, 119-126.

Dantzer, F., de La Rubia, G., Menissier-De Murcia, J., Hostomsky, Z., de Murcia, G., and Schreiber, V. (2000). Base excision repair is impaired in mammalian cells lacking Poly(ADP-ribose) polymerase-1. *Biochemistry* 39, 7559-7569.

Dantzer, F., Giraud-Panis, M.J., Jaco, I., Ame, J.C., Schultz, I., Blasco, M., Koering, C.E., Gilson, E., Menissier-de Murcia, J., de Murcia, G., *et al.* (2004). Functional interaction between poly(ADP-Ribose) polymerase 2 (PARP-2) and TRF2: PARP activity negatively regulates TRF2. *Mol Cell Biol* 24, 1595-1607.

Dantzer, F., Mark, M., Quenet, D., Scherthan, H., Huber, A., Liebe, B., Monaco, L., Chicheportiche, A., Sassone-Corsi, P., de Murcia, G., *et al.* (2006). Poly(ADP-ribose) polymerase-2 contributes to the fidelity of male meiosis I and spermiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 14854-14859.

Dantzer, F., Noel, G., and Schreiber, V. (2011). [PARP inhibitors: significant progress in cancer therapy]. *Bull Cancer* 98, 277-290.

de Murcia, G., Huletsky, A., Lamarre, D., Gaudreau, A., Pouyet, J., Daune, M., and Poirier, G.G. (1986). Modulation of chromatin superstructure induced by poly(ADP-ribose) synthesis and degradation. *The Journal of biological chemistry* 261, 7011-7017.

de Murcia, J.M., Niedergang, C., Trucco, C., Ricoul, M., Dutrillaux, B., Mark, M., Oliver, F.J., Masson, M., Dierich, A., LeMeur, M., *et al.* (1997). Requirement of poly(ADP-ribose) polymerase in recovery from DNA damage in mice and in cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 7303-7307.

De Vos, M., Schreiber, V., and Dantzer, F. (2012). The diverse roles and clinical relevance of PARPs in DNA damage repair: current state of the art. *Biochem Pharmacol* 84, 137-146.

Deaton, A.M., and Bird, A. (2011). CpG islands and the regulation of transcription. *Genes Dev* 25, 1010-1022.

Di Paola, S., Micaroni, M., Di Tullio, G., Buccione, R., and Di Girolamo, M. (2012). PARP16/ARTD15 is a novel endoplasmic-reticulum-associated mono-ADP-ribosyltransferase that interacts with, and modifies karyopherin-ss1. *PLoS One* 7, e37352.

Drygin, D., Rice, W.G., and Grummt, I. (2010). The RNA polymerase I transcription machinery: an emerging target for the treatment of cancer. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 50, 131-156.

Dunker, A.K., Brown, C.J., Lawson, J.D., Iakoucheva, L.M., and Obradovic, Z. (2002). Intrinsic disorder and protein function. *Biochemistry* 41, 6573-6582.

Dyson, H.J., and Wright, P.E. (2005). Intrinsically unstructured proteins and their functions. *Nature reviews Molecular cell biology* 6, 197-208.

Edinger, A.L., and Thompson, C.B. (2004). Death by design: apoptosis, necrosis and autophagy. *Curr Opin Cell Biol* 16, 663-669.

El-Khamisy, S.F., Masutani, M., Suzuki, H., and Caldecott, K.W. (2003). A requirement for PARP-1 for the assembly or stability of XRCC1 nuclear foci at sites of oxidative DNA damage. *Nucleic Acids Res* 31, 5526-5533.

Farmer, H., McCabe, N., Lord, C.J., Tutt, A.N., Johnson, D.A., Richardson, T.B., Santarosa, M., Dillon, K.J., Hickson, I., Knights, C., *et al.* (2005). Targeting the DNA repair defect in BRCA mutant cells as a therapeutic strategy. *Nature* 434, 917-921.

Farres, J., Martin-Caballero, J., Martinez, C., Lozano, J.J., Llacuna, L., Ampurdanes, C., Ruiz-Herguido, C., Dantzer, F., Schreiber, V., Villunger, A., *et al.* (2013). PARP-2 is required to maintain hematopoiesis following sublethal gamma-irradiation in mice. *Blood*.

Feijs, K.L., Kleine, H., Braczynski, A., Forst, A.H., Herzog, N., Verheugd, P., Linzen, U., Kremmer, E., and Luscher, B. (2013). ARTD10 substrate identification on protein microarrays: regulation of GSK3beta by mono-ADP-ribosylation. *Cell Commun Signal* 11, 5.

Feldman, J.L., Dittenhafer-Reed, K.E., and Denu, J.M. (2012). Sirtuin catalysis and regulation. *The Journal of biological chemistry* 287, 42419-42427.

Fenton, A.L., Shirodkar, P., Macrae, C.J., Meng, L., and Koch, C.A. (2013). The PARP3- and ATM-dependent phosphorylation of APLF facilitates DNA double-strand break repair. *Nucleic Acids Res* 41, 4080-4092.

Fisher, A.E., Hohegger, H., Takeda, S., and Caldecott, K.W. (2007). Poly(ADP-ribose) polymerase 1 accelerates single-strand break repair in concert with poly(ADP-ribose) glycohydrolase. *Mol Cell Biol* 27, 5597-5605.

Gagne, J.P., Hunter, J.M., Labrecque, B., Chabot, B., and Poirier, G.G. (2003). A proteomic approach to the identification of heterogeneous nuclear ribonucleoproteins as a new family of poly(ADP-ribose)-binding proteins. *Biochem J* 371, 331-340.

Gagne, J.P., Isabelle, M., Lo, K.S., Bourassa, S., Hendzel, M.J., Dawson, V.L., Dawson, T.M., and Poirier, G.G. (2008). Proteome-wide identification of poly(ADP-ribose) binding proteins and poly(ADP-ribose)-associated protein complexes. *Nucleic Acids Res* 36, 6959-6976.

Gagne, J.P., Rouleau, M., and Poirier, G.G. (2012). Structural biology. PARP-1 activation--bringing the pieces together. *Science* 336, 678-679.

Gerber, J.K., Gogel, E., Berger, C., Wallisch, M., Muller, F., Grummt, I., and Grummt, F. (1997). Termination of mammalian rDNA replication: polar arrest of replication fork movement by transcription termination factor TTF-I. *Cell* 90, 559-567.

Gerczei, T., and Correll, C.C. (2004). Imp3p and Imp4p mediate formation of essential U3-precursor rRNA (pre-rRNA) duplexes, possibly to recruit the small subunit processome to the pre-rRNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 15301-15306.

- Gibson, B.A., and Kraus, W.L. (2012). New insights into the molecular and cellular functions of poly(ADP-ribose) and PARPs. *Nature reviews* 13, 411-424.
- Godon, C., Cordelieres, F.P., Biard, D., Giocanti, N., Megnin-Chanet, F., Hall, J., and Favaudon, V. (2008). PARP inhibition versus PARP-1 silencing: different outcomes in terms of single-strand break repair and radiation susceptibility. *Nucleic Acids Res* 36, 4454-4464.
- Gomez, M., Wu, J., Schreiber, V., Dunlap, J., Dantzer, F., Wang, Y., and Liu, Y. (2006). PARP1 Is a TRF2-associated poly(ADP-ribose)polymerase and protects eroded telomeres. *Mol Biol Cell* 17, 1686-1696.
- Grandori, C., Gomez-Roman, N., Felton-Edkins, Z.A., Ngouenet, C., Galloway, D.A., Eisenman, R.N., and White, R.J. (2005). c-Myc binds to human ribosomal DNA and stimulates transcription of rRNA genes by RNA polymerase I. *Nat Cell Biol* 7, 311-318.
- Grob, A., Roussel, P., Wright, J.E., McStay, B., Hernandez-Verdun, D., and Sirri, V. (2009). Involvement of SIRT7 in resumption of rDNA transcription at the exit from mitosis. *Journal of cell science* 122, 489-498.
- Grueneberg, D.A., Pablo, L., Hu, K.Q., August, P., Weng, Z., and Papkoff, J. (2003). A functional screen in human cells identifies UBF2 as an RNA polymerase II transcription factor that enhances the beta-catenin signaling pathway. *Mol Cell Biol* 23, 3936-3950.
- Grummt, I. (2010). Wisely chosen paths--regulation of rRNA synthesis: delivered on 30 June 2010 at the 35th FEBS Congress in Gothenburg, Sweden. *Febs J* 277, 4626-4639.
- Grummt, I., Rosenbauer, H., Niedermeyer, I., Maier, U., and Ohrlein, A. (1986). A repeated 18 bp sequence motif in the mouse rDNA spacer mediates binding of a nuclear factor and transcription termination. *Cell* 45, 837-846.
- Guastafierro, T., Catizone, A., Calabrese, R., Zampieri, M., Martella, O., Bacalini, M.G., Reale, A., Di Girolamo, M., Miccheli, M., Farrar, D., *et al.* (2013). ADP-ribose polymer depletion leads to nuclear Ctf re-localization and chromatin rearrangement(1). *Biochem J* 449, 623-630.
- Guetg, C., Lienemann, P., Sirri, V., Grummt, I., Hernandez-Verdun, D., Hottiger, M.O., Fussenegger, M., and Santoro, R. (2010). The NoRC complex mediates the heterochromatin formation and stability of silent rRNA genes and centromeric repeats. *Embo J* 29, 2135-2146.
- Guetg, C., and Santoro, R. (2012). Formation of nuclear heterochromatin: the nucleolar point of view. *Epigenetics : official journal of the DNA Methylation Society* 7, 811-814.
- Guetg, C., Scheifele, F., Rosenthal, F., Hottiger, M.O., and Santoro, R. (2012). Inheritance of silent rDNA chromatin is mediated by PARP1 via noncoding RNA. *Mol Cell* 45, 790-800.
- Haince, J.F., McDonald, D., Rodrigue, A., Dery, U., Masson, J.Y., Hendzel, M.J., and Poirier, G.G. (2008). PARP1-dependent kinetics of recruitment of MRE11 and NBS1 proteins to multiple DNA damage sites. *The Journal of biological chemistry* 283, 1197-1208.
- Hakme, A., Huber, A., Dolle, P., and Schreiber, V. (2008a). The macroPARP genes *Parp-9* and *Parp-14* are developmentally and differentially regulated in mouse tissues. *Dev Dyn* 237, 209-215.

- Hakme, A., Wong, H.K., Dantzer, F., and Schreiber, V. (2008b). The expanding field of poly(ADP-ribosylation) reactions. 'Protein Modifications: Beyond the Usual Suspects' Review Series. *EMBO reports* 9, 1094-1100.
- Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell* 100, 57-70.
- Hannan, K.M., Brandenburger, Y., Jenkins, A., Sharkey, K., Cavanaugh, A., Rothblum, L., Moss, T., Poortinga, G., McArthur, G.A., Pearson, R.B., *et al.* (2003). mTOR-dependent regulation of ribosomal gene transcription requires S6K1 and is mediated by phosphorylation of the carboxy-terminal activation domain of the nucleolar transcription factor UBF. *Mol Cell Biol* 23, 8862-8877.
- Hannan, K.M., Kennedy, B.K., Cavanaugh, A.H., Hannan, R.D., Hirschler-Laszkiewicz, I., Jefferson, L.S., and Rothblum, L.I. (2000). RNA polymerase I transcription in confluent cells: Rb downregulates rDNA transcription during confluence-induced cell cycle arrest. *Oncogene* 19, 3487-3497.
- Hassa, P.O., Buerki, C., Lombardi, C., Imhof, R., and Hottiger, M.O. (2003). Transcriptional coactivation of nuclear factor-kappaB-dependent gene expression by p300 is regulated by poly(ADP)-ribose polymerase-1. *The Journal of biological chemistry* 278, 45145-45153.
- Hassa, P.O., Covic, M., Hasan, S., Imhof, R., and Hottiger, M.O. (2001). The enzymatic and DNA binding activity of PARP-1 are not required for NF-kappa B coactivator function. *The Journal of biological chemistry* 276, 45588-45597.
- Hassa, P.O., Haenni, S.S., Buerki, C., Meier, N.I., Lane, W.S., Owen, H., Gersbach, M., Imhof, R., and Hottiger, M.O. (2005). Acetylation of poly(ADP-ribose) polymerase-1 by p300/CREB-binding protein regulates coactivation of NF-kappaB-dependent transcription. *The Journal of biological chemistry* 280, 40450-40464.
- Hayakawa, S., Shiratori, S., Yamato, H., Kameyama, T., Kitatsuji, C., Kashigi, F., Goto, S., Kameoka, S., Fujikura, D., Yamada, T., *et al.* (2011). ZAPS is a potent stimulator of signaling mediated by the RNA helicase RIG-I during antiviral responses. *Nat Immunol* 12, 37-44.
- Heeres, J.T., and Hergenrother, P.J. (2007). Poly(ADP-ribose) makes a date with death. *Curr Opin Chem Biol* 11, 644-653.
- Henning, D., So, R.B., Jin, R., Lau, L.F., and Valdez, B.C. (2003). Silencing of RNA helicase II/Galpha inhibits mammalian ribosomal RNA production. *The Journal of biological chemistry* 278, 52307-52314.
- Hoppe, S., Bierhoff, H., Cado, I., Weber, A., Tiebe, M., Grummt, I., and Voit, R. (2009). AMP-activated protein kinase adapts rRNA synthesis to cellular energy supply. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 17781-17786.
- Hottiger, M.O., Hassa, P.O., Luscher, B., Schuler, H., and Koch-Nolte, F. (2010). Toward a unified nomenclature for mammalian ADP-ribosyltransferases. *Trends in biochemical sciences* 35, 208-219.
- Hsiao, S.J., and Smith, S. (2008). Tankyrase function at telomeres, spindle poles, and beyond. *Biochimie* 90, 83-92.

- Huambachano, O., Herrera, F., Rancourt, A., and Satoh, M.S. (2011). Double-stranded DNA binding domain of poly(ADP-ribose) polymerase-1 and molecular insight into the regulation of its activity. *The Journal of biological chemistry* 286, 7149-7160.
- Huang, J.Y., Chen, W.H., Chang, Y.L., Wang, H.T., Chuang, W.T., and Lee, S.C. (2006). Modulation of nucleosome-binding activity of FACT by poly(ADP-ribosylation). *Nucleic Acids Res* 34, 2398-2407.
- Huang, S.M., Mishina, Y.M., Liu, S., Cheung, A., Stegmeier, F., Michaud, G.A., Charlat, O., Wielle, E., Zhang, Y., Wiessner, S., *et al.* (2009). Tankyrase inhibition stabilizes axin and antagonizes Wnt signalling. *Nature* 461, 614-620.
- Hunter, J.E., Willmore, E., Irving, J.A., Hostomsky, Z., Veuger, S.J., and Durkacz, B.W. (2012). NF-kappaB mediates radio-sensitization by the PARP-1 inhibitor, AG-014699. *Oncogene* 31, 251-264.
- Idogawa, M., Masutani, M., Shitashige, M., Honda, K., Tokino, T., Shinomura, Y., Imai, K., Hirohashi, S., and Yamada, T. (2007). Ku70 and poly(ADP-ribose) polymerase-1 competitively regulate beta-catenin and T-cell factor-4-mediated gene transactivation: possible linkage of DNA damage recognition and Wnt signaling. *Cancer Res* 67, 911-918.
- Isabelle, M., Moreel, X., Gagne, J.P., Rouleau, M., Ethier, C., Gagne, P., Hendzel, M.J., and Poirier, G.G. (2010). Investigation of PARP-1, PARP-2, and PARG interactomes by affinity-purification mass spectrometry. *Proteome Sci* 8, 22.
- Jankevicius, G., Hassler, M., Golia, B., Rybin, V., Zacharias, M., Timinszky, G., and Ladurner, A.G. (2013). A family of macrodomain proteins reverses cellular mono-ADP-ribosylation. *Nat Struct Mol Biol* 20, 508-514.
- Ju, B.G., Lunyak, V.V., Perissi, V., Garcia-Bassets, I., Rose, D.W., Glass, C.K., and Rosenfeld, M.G. (2006). A topoisomerase IIbeta-mediated dsDNA break required for regulated transcription. *Science* 312, 1798-1802.
- Ju, B.G., and Rosenfeld, M.G. (2006). A breaking strategy for topoisomerase IIbeta/PARP-1-dependent regulated transcription. *Cell Cycle* 5, 2557-2560.
- Kalisch, T., Ame, J.C., Dantzer, F., and Schreiber, V. (2012). New readers and interpretations of poly(ADP-ribosylation). *Trends in biochemical sciences* 37, 381-390.
- Kang, H.C., Lee, Y.I., Shin, J.H., Andrabi, S.A., Chi, Z., Gagne, J.P., Lee, Y., Ko, H.S., Lee, B.D., Poirier, G.G., *et al.* (2011). Iduna is a poly(ADP-ribose) (PAR)-dependent E3 ubiquitin ligase that regulates DNA damage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, 14103-14108.
- Karner, C.M., Merkel, C.E., Dodge, M., Ma, Z., Lu, J., Chen, C., Lum, L., and Carroll, T.J. (2010). Tankyrase is necessary for canonical Wnt signaling during kidney development. *Dev Dyn* 239, 2014-2023.
- Karras, G.I., Kustatscher, G., Buhecha, H.R., Allen, M.D., Pugieux, C., Sait, F., Bycroft, M., and Ladurner, A.G. (2005). The macro domain is an ADP-ribose binding module. *Embo J* 24, 1911-1920.

- Kermekchiev, M., Workman, J.L., and Pikaard, C.S. (1997). Nucleosome binding by the polymerase I transactivator upstream binding factor displaces linker histone H1. *Mol Cell Biol* *17*, 5833-5842.
- Kickhoefer, V.A., Siva, A.C., Kedersha, N.L., Inman, E.M., Ruland, C., Streuli, M., and Rome, L.H. (1999). The 193-kD vault protein, VPARP, is a novel poly(ADP-ribose) polymerase. *J Cell Biol* *146*, 917-928.
- Kim, M.Y., Mauro, S., Gevry, N., Lis, J.T., and Kraus, W.L. (2004). NAD⁺-dependent modulation of chromatin structure and transcription by nucleosome binding properties of PARP-1. *Cell* *119*, 803-814.
- Kleine, H., Poreba, E., Lesniewicz, K., Hassa, P.O., Hottiger, M.O., Litchfield, D.W., Shilton, B.H., and Luscher, B. (2008). Substrate-assisted catalysis by PARP10 limits its activity to mono-ADP-ribosylation. *Mol Cell* *32*, 57-69.
- Koch-Nolte, F., Fischer, S., Haag, F., and Ziegler, M. (2011). Compartmentation of NAD⁺-dependent signalling. *FEBS Lett* *585*, 1651-1656.
- Koh, D.W., Lawler, A.M., Poitras, M.F., Sasaki, M., Wattler, S., Nehls, M.C., Stoger, T., Poirier, G.G., Dawson, V.L., and Dawson, T.M. (2004). Failure to degrade poly(ADP-ribose) causes increased sensitivity to cytotoxicity and early embryonic lethality. *Proc Natl Acad Sci U S A* *101*, 17699-17704.
- Kotova, E., Lodhi, N., Jarnik, M., Pinnola, A.D., Ji, Y., and Tulin, A.V. (2011). Drosophila histone H2A variant (H2Av) controls poly(ADP-ribose) polymerase 1 (PARP1) activation in chromatin. *Proc Natl Acad Sci U S A* *108*, 6205-6210.
- Kraus, W.L. (2008). Transcriptional control by PARP-1: chromatin modulation, enhancer-binding, coregulation, and insulation. *Curr Opin Cell Biol* *20*, 294-302.
- Kraus, W.L., and Hottiger, M.O. (2013). PARP-1 and gene regulation: Progress and puzzles. *Molecular aspects of medicine*.
- Krietsch, J., Caron, M.C., Gagne, J.P., Ethier, C., Vignard, J., Vincent, M., Rouleau, M., Hendzel, M.J., Poirier, G.G., and Masson, J.Y. (2012a). PARP activation regulates the RNA-binding protein NONO in the DNA damage response to DNA double-strand breaks. *Nucleic Acids Res* *40*, 10287-10301.
- Krietsch, J., Rouleau, M., Pic, E., Ethier, C., Dawson, T.M., Dawson, V.L., Masson, J.Y., Poirier, G.G., and Gagne, J.P. (2012b). Reprogramming cellular events by poly(ADP-ribose)-binding proteins. *Molecular aspects of medicine*.
- Krishnakumar, R., Gamble, M.J., Frizzell, K.M., Berrocal, J.G., Kininis, M., and Kraus, W.L. (2008). Reciprocal binding of PARP-1 and histone H1 at promoters specifies transcriptional outcomes. *Science* *319*, 819-821.
- Krishnakumar, R., and Kraus, W.L. (2010a). The PARP side of the nucleus: molecular actions, physiological outcomes, and clinical targets. *Mol Cell* *39*, 8-24.
- Krishnakumar, R., and Kraus, W.L. (2010b). PARP-1 regulates chromatin structure and transcription through a KDM5B-dependent pathway. *Mol Cell* *39*, 736-749.

- Kuhn, A., Vente, A., Doree, M., and Grummt, I. (1998). Mitotic phosphorylation of the TBP-containing factor SL1 represses ribosomal gene transcription. *J Mol Biol* 284, 1-5.
- Kutuzov, M.M., Khodyreva, S.N., Ame, J.C., Ilina, E.S., Sukhanova, M.V., Schreiber, V., and Lavrik, O.I. (2013). Interaction of PARP-2 with DNA structures mimicking DNA repair intermediates and consequences on activity of base excision repair proteins. *Biochimie* 95, 1208-1215.
- Lai, Y.S., Chang, C.W., Pawlik, K.M., Zhou, D., Renfrow, M.B., and Townes, T.M. (2012). SRY (sex determining region Y)-box2 (Sox2)/poly ADP-ribose polymerase 1 (Parp1) complexes regulate pluripotency. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109, 3772-3777.
- Langelier, M.F., Planck, J.L., Roy, S., and Pascal, J.M. (2011). Crystal structures of poly(ADP-ribose) polymerase-1 (PARP-1) zinc fingers bound to DNA: structural and functional insights into DNA-dependent PARP-1 activity. *The Journal of biological chemistry* 286, 10690-10701.
- Langelier, M.F., Planck, J.L., Roy, S., and Pascal, J.M. (2012). Structural basis for DNA damage-dependent poly(ADP-ribosylation) by human PARP-1. *Science* 336, 728-732.
- Langelier, M.F., Ruhl, D.D., Planck, J.L., Kraus, W.L., and Pascal, J.M. (2010). The Zn3 domain of human poly(ADP-ribose) polymerase-1 (PARP-1) functions in both DNA-dependent poly(ADP-ribose) synthesis activity and chromatin compaction. *The Journal of biological chemistry* 285, 18877-18887.
- Langelier, M.F., Servent, K.M., Rogers, E.E., and Pascal, J.M. (2008). A third zinc-binding domain of human poly(ADP-ribose) polymerase-1 coordinates DNA-dependent enzyme activation. *The Journal of biological chemistry* 283, 4105-4114.
- Lara, P.C., Pruschy, M., Zimmermann, M., and Henriquez-Hernandez, L.A. (2011). MVP and vaults: a role in the radiation response. *Radiat Oncol* 6, 148.
- Lazebnik, Y.A., Kaufmann, S.H., Desnoyers, S., Poirier, G.G., and Earnshaw, W.C. (1994). Cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase by a proteinase with properties like ICE. *Nature* 371, 346-347.
- Le May, N., Iltis, I., Ame, J.C., Zhovmer, A., Biard, D., Egly, J.M., Schreiber, V., and Coin, F. (2012). Poly (ADP-ribose) glycohydrolase regulates retinoic acid receptor-mediated gene expression. *Mol Cell* 48, 785-798.
- Leppard, J.B., Dong, Z., Mackey, Z.B., and Tomkinson, A.E. (2003). Physical and functional interaction between DNA ligase IIIalpha and poly(ADP-Ribose) polymerase 1 in DNA single-strand break repair. *Mol Cell Biol* 23, 5919-5927.
- Leung, A., Todorova, T., Ando, Y., and Chang, P. (2012). Poly(ADP-ribose) regulates post-transcriptional gene regulation in the cytoplasm. *RNA Biol* 9, 542-548.
- Levin, D.S., McKenna, A.E., Motycka, T.A., Matsumoto, Y., and Tomkinson, A.E. (2000). Interaction between PCNA and DNA ligase I is critical for joining of Okazaki fragments and long-patch base-excision repair. *Curr Biol* 10, 919-922.

Liang, Y.C., Hsu, C.Y., Yao, Y.L., and Yang, W.M. (2013). PARP-2 regulates cell cycle-related genes through histone deacetylation and methylation independently of poly(ADP-ribose)ylation. *Biochem Biophys Res Commun* 431, 58-64.

Lindahl, T., Satoh, M.S., Poirier, G.G., and Klungland, A. (1995). Post-translational modification of poly(ADP-ribose) polymerase induced by DNA strand breaks. *Trends in biochemical sciences* 20, 405-411.

Loeffler, P.A., Cuneo, M.J., Mueller, G.A., DeRose, E.F., Gabel, S.A., and London, R.E. (2011). Structural studies of the PARP-1 BRCT domain. *BMC Struct Biol* 11, 37.

Lonskaya, I., Potaman, V.N., Shlyakhtenko, L.S., Oussatcheva, E.A., Lyubchenko, Y.L., and Soldatenkov, V.A. (2005). Regulation of poly(ADP-ribose) polymerase-1 by DNA structure-specific binding. *The Journal of biological chemistry* 280, 17076-17083.

Luo, X., and Kraus, W.L. (2012). On PAR with PARP: cellular stress signaling through poly(ADP-ribose) and PARP-1. *Genes Dev* 26, 417-432.

Ma, Q., Baldwin, K.T., Renzelli, A.J., McDaniel, A., and Dong, L. (2001). TCDD-inducible poly(ADP-ribose) polymerase: a novel response to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Biochem Biophys Res Commun* 289, 499-506.

Mabley, J.G., Suarez-Pinzon, W.L., Hasko, G., Salzman, A.L., Rabinovitch, A., Kun, E., and Szabo, C. (2001). Inhibition of poly (ADP-ribose) synthetase by gene disruption or inhibition with 5-iodo-6-amino-1,2-benzopyrone protects mice from multiple-low-dose-streptozotocin-induced diabetes. *Br J Pharmacol* 133, 909-919.

MacDonald, B.T., Tamai, K., and He, X. (2009). Wnt/beta-catenin signaling: components, mechanisms, and diseases. *Dev Cell* 17, 9-26.

MacPherson, L., Tamblyn, L., Rajendra, S., Bralha, F., McPherson, J.P., and Matthews, J. (2013). 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin poly(ADP-ribose) polymerase (TiPARP, ARTD14) is a mono-ADP-ribosyltransferase and repressor of aryl hydrocarbon receptor transactivation. *Nucleic Acids Res* 41, 1604-1621.

Maeda, Y., Hunter, T.C., Loudy, D.E., Dave, V., Schreiber, V., and Whitsett, J.A. (2006). PARP-2 interacts with TTF-1 and regulates expression of surfactant protein-B. *The Journal of biological chemistry* 281, 9600-9606.

Malewicz, M., Kadkhodaei, B., Kee, N., Volakakis, N., Hellman, U., Viktorsson, K., Leung, C.Y., Chen, B., Lewensohn, R., van Gent, D.C., *et al.* (2011). Essential role for DNA-PK-mediated phosphorylation of NR4A nuclear orphan receptors in DNA double-strand break repair. *Genes Dev* 25, 2031-2040.

Masson, M., Menissier-de Murcia, J., Mattei, M.G., de Murcia, G., and Niedergang, C.P. (1997). Poly(ADP-ribose) polymerase interacts with a novel human ubiquitin conjugating enzyme: hUbc9. *Gene* 190, 287-296.

Masson, M., Niedergang, C., Schreiber, V., Muller, S., Menissier-de Murcia, J., and de Murcia, G. (1998). XRCC1 is specifically associated with poly(ADP-ribose) polymerase and negatively regulates its activity following DNA damage. *Mol Cell Biol* 18, 3563-3571.

- Mastrocola, A.S., Kim, S.H., Trinh, A.T., Rodenkirch, L.A., and Tibbetts, R.S. (2013). The RNA Binding Protein Fused In Sarcoma (FUS) Functions Downstream of PARP in Response to DNA Damage. *The Journal of biological chemistry*.
- Masutani, M., Nozaki, T., Nakamoto, K., Nakagama, H., Suzuki, H., Kusuoka, O., Tsutsumi, M., and Sugimura, T. (2000). The response of Parp knockout mice against DNA damaging agents. *Mutat Res* 462, 159-166.
- Mayer, C., Bierhoff, H., and Grummt, I. (2005). The nucleolus as a stress sensor: JNK2 inactivates the transcription factor TIF-IA and down-regulates rRNA synthesis. *Genes Dev* 19, 933-941.
- Mayer, C., Schmitz, K.M., Li, J., Grummt, I., and Santoro, R. (2006). Intergenic transcripts regulate the epigenetic state of rRNA genes. *Mol Cell* 22, 351-361.
- McMahon, M., Ayllon, V., Panov, K.I., and O'Connor, R. (2010). Ribosomal 18 S RNA processing by the IGF-I-responsive WDR3 protein is integrated with p53 function in cancer cell proliferation. *The Journal of biological chemistry* 285, 18309-18318.
- Meder, V.S., Boeglin, M., de Murcia, G., and Schreiber, V. (2005). PARP-1 and PARP-2 interact with nucleophosmin/B23 and accumulate in transcriptionally active nucleoli. *J Cell Sci* 118, 211-222.
- Mehrotra, P., Riley, J.P., Patel, R., Li, F., Voss, L., and Goenka, S. (2011). PARP-14 functions as a transcriptional switch for Stat6-dependent gene activation. *The Journal of biological chemistry* 286, 1767-1776.
- Menissier de Murcia, J., Ricoul, M., Tartier, L., Niedergang, C., Huber, A., Dantzer, F., Schreiber, V., Ame, J.C., Dierich, A., LeMeur, M., *et al.* (2003). Functional interaction between PARP-1 and PARP-2 in chromosome stability and embryonic development in mouse. *Embo J* 22, 2255-2263.
- Messner, S., Altmeyer, M., Zhao, H., Pozivil, A., Roschitzki, B., Gehrig, P., Rutishauser, D., Huang, D., Caflisch, A., and Hottiger, M.O. (2010). PARP1 ADP-ribosylates lysine residues of the core histone tails. *Nucleic Acids Res* 38, 6350-6362.
- Messner, S., and Hottiger, M.O. (2011). Histone ADP-ribosylation in DNA repair, replication and transcription. *Trends Cell Biol* 21, 534-542.
- Minaga, T., and Kun, E. (1983). Probable helical conformation of poly(ADP-ribose). The effect of cations on spectral properties. *The Journal of biological chemistry* 258, 5726-5730.
- Moore, H.M., Bai, B., Boisvert, F.M., Latonen, L., Rantanen, V., Simpson, J.C., Pepperkok, R., Lamond, A.I., and Laiho, M. (2011). Quantitative proteomics and dynamic imaging of the nucleolus reveal distinct responses to UV and ionizing radiation. *Mol Cell Proteomics* 10, M111 009241.
- Mortusewicz, O., Ame, J.C., Schreiber, V., and Leonhardt, H. (2007). Feedback-regulated poly(ADP-ribosylation) by PARP-1 is required for rapid response to DNA damage in living cells. *Nucleic Acids Res* 35, 7665-7675.

Mullineux, S.T., and Lafontaine, D.L. (2012). Mapping the cleavage sites on mammalian pre-rRNAs: where do we stand? *Biochimie* 94, 1521-1532.

Munoz-Gamez, J.A., Rodriguez-Vargas, J.M., Quiles-Perez, R., Aguilar-Quesada, R., Martin-Oliva, D., de Murcia, G., Menissier de Murcia, J., Almendros, A., Ruiz de Almodovar, M., and Oliver, F.J. (2009). PARP-1 is involved in autophagy induced by DNA damage. *Autophagy* 5, 61-74.

Musinova, Y.R., Lisitsyna, O.M., Golyshev, S.A., Tuzhikov, A.I., Polyakov, V.Y., and Sheval, E.V. (2011). Nucleolar localization/retention signal is responsible for transient accumulation of histone H2B in the nucleolus through electrostatic interactions. *Biochim Biophys Acta* 1813, 27-38.

Nicolas, L., Martinez, C., Baro, C., Rodriguez, M., Baroja-Mazo, A., Sole, F., Flores, J.M., Ampurdanes, C., Dantzer, F., Martin-Caballero, J., *et al.* (2010). Loss of poly(ADP-ribose) polymerase-2 leads to rapid development of spontaneous T-cell lymphomas in p53-deficient mice. *Oncogene* 29, 2877-2883.

Nie, J., Sakamoto, S., Song, D., Qu, Z., Ota, K., and Taniguchi, T. (1998). Interaction of Oct-1 and automodification domain of poly(ADP-ribose) synthetase. *FEBS Lett* 424, 27-32.

Niehrs, C. (2012). The complex world of WNT receptor signalling. *Nature reviews Molecular cell biology* 13, 767-779.

Nirodi, C., NagDas, S., Gygi, S.P., Olson, G., Aebersold, R., and Richmond, A. (2001). A role for poly(ADP-ribose) polymerase in the transcriptional regulation of the melanoma growth stimulatory activity (CXCL1) gene expression. *The Journal of biological chemistry* 276, 9366-9374.

Nosho, K., Yamamoto, H., Mikami, M., Taniguchi, H., Takahashi, T., Adachi, Y., Imamura, A., Imai, K., and Shinomura, Y. (2006). Overexpression of poly(ADP-ribose) polymerase-1 (PARP-1) in the early stage of colorectal carcinogenesis. *Eur J Cancer* 42, 2374-2381.

O'Mahony, D.J., Xie, W.Q., Smith, S.D., Singer, H.A., and Rothblum, L.I. (1992). Differential phosphorylation and localization of the transcription factor UBF in vivo in response to serum deprivation. In vitro dephosphorylation of UBF reduces its transactivation properties. *The Journal of biological chemistry* 267, 35-38.

O'Sullivan, A.C., Sullivan, G.J., and McStay, B. (2002). UBF binding in vivo is not restricted to regulatory sequences within the vertebrate ribosomal DNA repeat. *Mol Cell Biol* 22, 657-668.

Oberoi, J., Richards, M.W., Crumpler, S., Brown, N., Blagg, J., and Bayliss, R. (2010). Structural basis of poly(ADP-ribose) recognition by the multizinc binding domain of checkpoint with forkhead-associated and RING Domains (CHFR). *The Journal of biological chemistry* 285, 39348-39358.

Ogino, H., Nozaki, T., Gunji, A., Maeda, M., Suzuki, H., Ohta, T., Murakami, Y., Nakagama, H., Sugimura, T., and Masutani, M. (2007). Loss of Parp-1 affects gene expression profile in a genome-wide manner in ES cells and liver cells. *BMC Genomics* 8, 41.

- Okano, S., Lan, L., Caldecott, K.W., Mori, T., and Yasui, A. (2003). Spatial and temporal cellular responses to single-strand breaks in human cells. *Mol Cell Biol* 23, 3974-3981.
- Olabisi, O.A., Soto-Nieves, N., Nieves, E., Yang, T.T., Yang, X., Yu, R.Y., Suk, H.Y., Macian, F., and Chow, C.W. (2008). Regulation of transcription factor NFAT by ADP-ribosylation. *Mol Cell Biol* 28, 2860-2871.
- Oliver, F.J., de la Rubia, G., Rolli, V., Ruiz-Ruiz, M.C., de Murcia, G., and Murcia, J.M. (1998). Importance of poly(ADP-ribose) polymerase and its cleavage in apoptosis. Lesson from an uncleavable mutant. *The Journal of biological chemistry* 273, 33533-33539.
- Oliver, F.J., Menissier-de Murcia, J., Nacci, C., Decker, P., Andriantsitohaina, R., Muller, S., de la Rubia, G., Stoclet, J.C., and de Murcia, G. (1999). Resistance to endotoxic shock as a consequence of defective NF-kappaB activation in poly (ADP-ribose) polymerase-1 deficient mice. *Embo J* 18, 4446-4454.
- Ouararhni, K., Hadj-Slimane, R., Ait-Si-Ali, S., Robin, P., Mietton, F., Harel-Bellan, A., Dimitrov, S., and Hamiche, A. (2006). The histone variant mH2A1.1 interferes with transcription by down-regulating PARP-1 enzymatic activity. *Genes Dev* 20, 3324-3336.
- Ozaki, Y., Matsui, H., Asou, H., Nagamachi, A., Aki, D., Honda, H., Yasunaga, S., Takihara, Y., Yamamoto, T., Izumi, S., *et al.* (2012). Poly-ADP ribosylation of Miki by tankyrase-1 promotes centrosome maturation. *Mol Cell* 47, 694-706.
- Pavri, R., Lewis, B., Kim, T.K., Dilworth, F.J., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., de Murcia, G., Evans, R., Chambon, P., and Reinberg, D. (2005). PARP-1 determines specificity in a retinoid signaling pathway via direct modulation of mediator. *Mol Cell* 18, 83-96.
- Pears, C.J., Couto, C.A., Wang, H.Y., Borer, C., Kiely, R., and Lakin, N.D. (2012). The role of ADP-ribosylation in regulating DNA double-strand break repair. *Cell Cycle* 11, 48-56.
- Pehrson, J.R., and Fried, V.A. (1992). MacroH2A, a core histone containing a large nonhistone region. *Science* 257, 1398-1400.
- Petesich, S.J., and Lis, J.T. (2012). Activator-induced spread of poly(ADP-ribose) polymerase promotes nucleosome loss at Hsp70. *Mol Cell* 45, 64-74.
- Pinnola, A., Naumova, N., Shah, M., and Tulin, A.V. (2007). Nucleosomal core histones mediate dynamic regulation of poly(ADP-ribose) polymerase 1 protein binding to chromatin and induction of its enzymatic activity. *The Journal of biological chemistry* 282, 32511-32519.
- Pion, E., Bombarda, E., Stiegler, P., Ullmann, G.M., Mely, Y., de Murcia, G., and Gerard, D. (2003). Poly(ADP-ribose) polymerase-1 dimerizes at a 5' recessed DNA end in vitro: a fluorescence study. *Biochemistry* 42, 12409-12417.
- Pleschke, J.M., Kleczkowska, H.E., Strohm, M., and Althaus, F.R. (2000). Poly(ADP-ribose) binds to specific domains in DNA damage checkpoint proteins. *The Journal of biological chemistry* 275, 40974-40980.
- Poirier, G.G., Niedergang, C., Champagne, M., Mazen, A., and Mandel, P. (1982). Adenosine diphosphate ribosylation of chicken-erythrocyte histones H1, H5 and high-mobility-group

proteins by purified calf-thymus poly(adenosinediphosphate-ribose) polymerase. *Eur J Biochem* 127, 437-442.

Potaman, V.N., Shlyakhtenko, L.S., Oussatcheva, E.A., Lyubchenko, Y.L., and Soldatenkov, V.A. (2005). Specific binding of poly(ADP-ribose) polymerase-1 to cruciform hairpins. *J Mol Biol* 348, 609-615.

Prasad, R., Lavrik, O.I., Kim, S.J., Kedar, P., Yang, X.P., Vande Berg, B.J., and Wilson, S.H. (2001). DNA polymerase beta -mediated long patch base excision repair. Poly(ADP-ribose)polymerase-1 stimulates strand displacement DNA synthesis. *The Journal of biological chemistry* 276, 32411-32414.

Putnam, C.D., Copenhaver, G.P., Denton, M.L., and Pikaard, C.S. (1994). The RNA polymerase I transactivator upstream binding factor requires its dimerization domain and high-mobility-group (HMG) box 1 to bend, wrap, and positively supercoil enhancer DNA. *Mol Cell Biol* 14, 6476-6488.

Quenet, D., Gasser, V., Fouillen, L., Cammas, F., Sanglier-Cianferani, S., Losson, R., and Dantzer, F. (2008). The histone subcode: poly(ADP-ribose) polymerase-1 (Parp-1) and Parp-2 control cell differentiation by regulating the transcriptional intermediary factor TIF1beta and the heterochromatin protein HP1alpha. *Faseb J* 22, 3853-3865.

Quenet, D., Mark, M., Govin, J., van Dorsselaar, A., Schreiber, V., Khochbin, S., and Dantzer, F. (2009). Parp2 is required for the differentiation of post-meiotic germ cells: identification of a spermatid-specific complex containing Parp1, Parp2, TP2 and HSPA2. *Exp Cell Res* 315, 2824-2834.

Rajkowitsch, L., Chen, D., Stampfl, S., Semrad, K., Waldsich, C., Mayer, O., Jantsch, M.F., Konrat, R., Blasi, U., and Schroeder, R. (2007). RNA chaperones, RNA annealers and RNA helicases. *RNA Biol* 4, 118-130.

Rajkowitsch, L., and Schroeder, R. (2007). Dissecting RNA chaperone activity. *Rna* 13, 2053-2060.

Reale, A., Matteis, G.D., Galleazzi, G., Zampieri, M., and Caiafa, P. (2005). Modulation of DNMT1 activity by ADP-ribose polymers. *Oncogene* 24, 13-19.

Rippmann, J.F., Damm, K., and Schnapp, A. (2002). Functional characterization of the poly(ADP-ribose) polymerase activity of tankyrase 1, a potential regulator of telomere length. *J Mol Biol* 323, 217-224.

Rodriguez, M.I., Gonzalez-Flores, A., Dantzer, F., Collard, J., de Herreros, A.G., and Oliver, F.J. (2011). Poly(ADP-ribose)-dependent regulation of Snail1 protein stability. *Oncogene* 30, 4365-4372.

Rodriguez-Vargas, J.M., Ruiz-Magana, M.J., Ruiz-Ruiz, C., Majuelos-Melguizo, J., Peralta-Leal, A., Rodriguez, M.I., Munoz-Gamez, J.A., de Almodovar, M.R., Siles, E., Rivas, A.L., *et al.* (2012). ROS-induced DNA damage and PARP-1 are required for optimal induction of starvation-induced autophagy. *Cell Res* 22, 1181-1198.

- Rosenthal, F., Feijs, K.L., Frugier, E., Bonalli, M., Forst, A.H., Imhof, R., Winkler, H.C., Fischer, D., Caflisch, A., Hassa, P.O., *et al.* (2013). Macrod domain-containing proteins are new mono-ADP-ribosylhydrolases. *Nat Struct Mol Biol* 20, 502-507.
- Rosidi, B., Wang, M., Wu, W., Sharma, A., Wang, H., and Iliakis, G. (2008). Histone H1 functions as a stimulatory factor in backup pathways of NHEJ. *Nucleic Acids Res* 36, 1610-1623.
- Rouleau, M., McDonald, D., Gagne, P., Ouellet, M.E., Droit, A., Hunter, J.M., Dutertre, S., Prigent, C., Hendzel, M.J., and Poirier, G.G. (2007). PARP-3 associates with polycomb group bodies and with components of the DNA damage repair machinery. *J Cell Biochem* 100, 385-401.
- Rouleau, M., Saxena, V., Rodrigue, A., Paquet, E.R., Gagnon, A., Hendzel, M.J., Masson, J.Y., Ekker, M., and Poirier, G.G. (2011). A key role for poly(ADP-ribose) polymerase 3 in ectodermal specification and neural crest development. *PLoS One* 6, e15834.
- Rubbi, C.P., and Milner, J. (2003). Disruption of the nucleolus mediates stabilization of p53 in response to DNA damage and other stresses. *Embo J* 22, 6068-6077.
- Ruf, A., Mennissier de Murcia, J., de Murcia, G., and Schulz, G.E. (1996). Structure of the catalytic fragment of poly(AD-ribose) polymerase from chicken. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 7481-7485.
- Rulten, S.L., Fisher, A.E., Robert, I., Zuma, M.C., Rouleau, M., Ju, L., Poirier, G., Reina-San-Martin, B., and Caldecott, K.W. (2011). PARP-3 and APLF function together to accelerate nonhomologous end-joining. *Mol Cell* 41, 33-45.
- Sala, A., La Rocca, G., Burgio, G., Kotova, E., Di Gesu, D., Collesano, M., Ingrassia, A.M., Tulin, A.V., and Corona, D.F. (2008). The nucleosome-remodeling ATPase ISWI is regulated by poly-ADP-ribosylation. *PLoS Biol* 6, e252.
- Sani, E., and Hannan, R.D. (2009). The role of UBF in regulating the structure and dynamics of transcriptionally active rDNA chromatin. *Epigenetics* 4, 374-382.
- Sani, E., Poortinga, G., Sharkey, K., Hung, S., Holloway, T.P., Quin, J., Robb, E., Wong, L.H., Thomas, W.G., Stefanovsky, V., *et al.* (2008). UBF levels determine the number of active ribosomal RNA genes in mammals. *J Cell Biol* 183, 1259-1274.
- Santoro, R., and Grummt, I. (2001). Molecular mechanisms mediating methylation-dependent silencing of ribosomal gene transcription. *Mol Cell* 8, 719-725.
- Saxena, A., Saffery, R., Wong, L.H., Kalitsis, P., and Choo, K.H. (2002a). Centromere proteins Cenpa, Cenpb, and Bub3 interact with poly(ADP-ribose) polymerase-1 protein and are poly(ADP-ribosyl)ated. *J Biol Chem* 277, 26921-26926.
- Saxena, A., Wong, L.H., Kalitsis, P., Earle, E., Shaffer, L.G., and Choo, K.H. (2002b). Poly(ADP-ribose) polymerase 2 localizes to mammalian active centromeres and interacts with PARP-1, Cenpa, Cenpb and Bub3, but not Cenpc. *Hum Mol Genet* 11, 2319-2329.
- Schreiber, V., Ame, J.C., Dolle, P., Schultz, I., Rinaldi, B., Fraulob, V., Mennissier-de Murcia, J., and de Murcia, G. (2002). Poly(ADP-ribose) polymerase-2 (PARP-2) is required for

efficient base excision DNA repair in association with PARP-1 and XRCC1. *The Journal of biological chemistry* 277, 23028-23036.

Schreiber, V., Dantzer, F., Ame, J.C., and de Murcia, G. (2006). Poly(ADP-ribose): novel functions for an old molecule. *Nature reviews* 7, 517-528.

Schreiber, V., Molinete, M., Boeuf, H., de Murcia, G., and Menissier-de Murcia, J. (1992). The human poly(ADP-ribose) polymerase nuclear localization signal is a bipartite element functionally separate from DNA binding and catalytic activity. *Embo J* 11, 3263-3269.

Schultheisz, H.L., Szymczyna, B.R., and Williamson, J.R. (2009). Enzymatic synthesis and structural characterization of ¹³C, ¹⁵N-poly(ADP-ribose). *J Am Chem Soc* 131, 14571-14578.

Schultz, N., Lopez, E., Saleh-Gohari, N., and Helleday, T. (2003). Poly(ADP-ribose) polymerase (PARP-1) has a controlling role in homologous recombination. *Nucleic Acids Res* 31, 4959-4964.

Scott, M.S., Troshin, P.V., and Barton, G.J. (2011). NoD: a Nucleolar localization sequence detector for eukaryotic and viral proteins. *BMC bioinformatics* 12, 317.

Semrad, K. (2011). Proteins with RNA chaperone activity: a world of diverse proteins with a common task-impediment of RNA misfolding. *Biochemistry research international* 2011, 532908.

Semrad, K., and Schroeder, R. (1998). A ribosomal function is necessary for efficient splicing of the T4 phage thymidylate synthase intron in vivo. *Genes Dev* 12, 1327-1337.

Slattery, E., Dignam, J.D., Matsui, T., and Roeder, R.G. (1983). Purification and analysis of a factor which suppresses nick-induced transcription by RNA polymerase II and its identity with poly(ADP-ribose) polymerase. *The Journal of biological chemistry* 258, 5955-5959.

Smith, S., Gariat, I., Schmitt, A., and de Lange, T. (1998). Tankyrase, a poly(ADP-ribose) polymerase at human telomeres. *Science* 282, 1484-1487.

Stanisavljevic, J., Porta-de-la-Riva, M., Batlle, R., de Herreros, A.G., and Baulida, J. (2011). The p65 subunit of NF-kappaB and PARP1 assist Snail1 in activating fibronectin transcription. *Journal of cell science* 124, 4161-4171.

Stefanovsky, V., Langlois, F., Gagnon-Kugler, T., Rothblum, L.I., and Moss, T. (2006). Growth factor signaling regulates elongation of RNA polymerase I transcription in mammals via UBF phosphorylation and r-chromatin remodeling. *Mol Cell* 21, 629-639.

Stefanovsky, V.Y., Pelletier, G., Bazett-Jones, D.P., Crane-Robinson, C., and Moss, T. (2001). DNA looping in the RNA polymerase I enhancer is the result of non-cooperative in-phase bending by two UBF molecules. *Nucleic Acids Res* 29, 3241-3247.

Steffen, J.D., and Pascal, J.M. (2013). New players to the field of ADP-ribosylation make the final cut. *Embo J* 32, 1205-1207.

- Stilmann, M., Hinz, M., Arslan, S.C., Zimmer, A., Schreiber, V., and Scheidereit, C. (2009). A nuclear poly(ADP-ribose)-dependent signalosome confers DNA damage-induced IkappaB kinase activation. *Mol Cell* *36*, 365-378.
- Strom, C.E., Johansson, F., Uhlen, M., Szigyarto, C.A., Erixon, K., and Helleday, T. (2011). Poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) is not involved in base excision repair but PARP inhibition traps a single-strand intermediate. *Nucleic Acids Res* *39*, 3166-3175.
- Stros, M. (2010). HMGB proteins: interactions with DNA and chromatin. *Biochim Biophys Acta* *1799*, 101-113.
- Stros, M., Launholt, D., and Grasser, K.D. (2007). The HMG-box: a versatile protein domain occurring in a wide variety of DNA-binding proteins. *Cell Mol Life Sci* *64*, 2590-2606.
- Sukhanova, M., Khodyreva, S., and Lavrik, O. (2010). Poly(ADP-ribose) polymerase 1 regulates activity of DNA polymerase beta in long patch base excision repair. *Mutat Res* *685*, 80-89.
- Sukhanova, M.V., Khodyreva, S.N., Lebedeva, N.A., Prasad, R., Wilson, S.H., and Lavrik, O.I. (2005). Human base excision repair enzymes apurinic/apyrimidinic endonuclease1 (APE1), DNA polymerase beta and poly(ADP-ribose) polymerase 1: interplay between strand-displacement DNA synthesis and proofreading exonuclease activity. *Nucleic Acids Res* *33*, 1222-1229.
- Szanto, M., Brunyanszki, A., Kiss, B., Nagy, L., Gergely, P., Virag, L., and Bai, P. (2012). Poly(ADP-ribose) polymerase-2: emerging transcriptional roles of a DNA-repair protein. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* *69*, 4079-4092.
- Tao, Z., Gao, P., and Liu, H.W. (2009). Identification of the ADP-ribosylation sites in the PARP-1 automodification domain: analysis and implications. *J Am Chem Soc* *131*, 14258-14260.
- Thomas, C., and Tulin, A.V. (2013). Poly-ADP-ribose polymerase: Machinery for nuclear processes. *Molecular aspects of medicine*.
- Timinszky, G., Till, S., Hassa, P.O., Hothorn, M., Kustatscher, G., Nijmeijer, B., Colombelli, J., Altmeyer, M., Stelzer, E.H., Scheffzek, K., *et al.* (2009). A macrodomain-containing histone rearranges chromatin upon sensing PARP1 activation. *Nat Struct Mol Biol* *16*, 923-929.
- Tompa, P. (2012). Intrinsically disordered proteins: a 10-year recap. *Trends in biochemical sciences* *37*, 509-516.
- Tompa, P., and Csermely, P. (2004). The role of structural disorder in the function of RNA and protein chaperones. *Faseb J* *18*, 1169-1175.
- Torrano, V., Navascues, J., Docquier, F., Zhang, R., Burke, L.J., Chernukhin, I., Farrar, D., Leon, J., Berciano, M.T., Renkawitz, R., *et al.* (2006). Targeting of CTCF to the nucleolus inhibits nucleolar transcription through a poly(ADP-ribosyl)ation-dependent mechanism. *Journal of cell science* *119*, 1746-1759.

- Tulin, A., and Spradling, A. (2003). Chromatin loosening by poly(ADP)-ribose polymerase (PARP) at *Drosophila* puff loci. *Science* 299, 560-562.
- Tuncel, H., Tanaka, S., Oka, S., Nakai, S., Fukutomi, R., Okamoto, M., Ota, T., Kaneko, H., Tatsuka, M., and Shimamoto, F. (2012). PARP6, a mono(ADP-ribosyl) transferase and a negative regulator of cell proliferation, is involved in colorectal cancer development. *Int J Oncol* 41, 2079-2086.
- Uversky, V.N. (2011). Intrinsically disordered proteins from A to Z. *Int J Biochem Cell Biol* 43, 1090-1103.
- Valdor, R., Schreiber, V., Saenz, L., Martinez, T., Munoz-Suano, A., Dominguez-Villar, M., Ramirez, P., Parrilla, P., Aguado, E., Garcia-Cozar, F., *et al.* (2008). Regulation of NFAT by poly(ADP-ribose) polymerase activity in T cells. *Mol Immunol* 45, 1863-1871.
- Vascotto, C., Fantini, D., Romanello, M., Cesaratto, L., Deganuto, M., Leonardi, A., Radicella, J.P., Kelley, M.R., D'Ambrosio, C., Scaloni, A., *et al.* (2009). APE1/Ref-1 interacts with NPM1 within nucleoli and plays a role in the rRNA quality control process. *Mol Cell Biol* 29, 1834-1854.
- Vermeulen, M., Eberl, H.C., Matarese, F., Marks, H., Denissov, S., Butter, F., Lee, K.K., Olsen, J.V., Hyman, A.A., Stunnenberg, H.G., *et al.* (2010). Quantitative interaction proteomics and genome-wide profiling of epigenetic histone marks and their readers. *Cell* 142, 967-980.
- Vicent, G.P., Nacht, A.S., Font-Mateu, J., Castellano, G., Gaveglia, L., Ballare, C., and Beato, M. (2011). Four enzymes cooperate to displace histone H1 during the first minute of hormonal gene activation. *Genes Dev* 25, 845-862.
- Virag, L., Robaszkiewicz, A., Vargas, J.M., and Javier Oliver, F. (2013). Poly(ADP-ribose) signaling in cell death. *Molecular aspects of medicine*.
- Voit, R., and Grummt, I. (2001). Phosphorylation of UBF at serine 388 is required for interaction with RNA polymerase I and activation of rDNA transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 13631-13636.
- Voit, R., Hoffmann, M., and Grummt, I. (1999). Phosphorylation by G1-specific cdk-cyclin complexes activates the nucleolar transcription factor UBF. *Embo J* 18, 1891-1899.
- Wacker, D.A., Ruhl, D.D., Balagamwala, E.H., Hope, K.M., Zhang, T., and Kraus, W.L. (2007). The DNA binding and catalytic domains of poly(ADP-ribose) polymerase 1 cooperate in the regulation of chromatin structure and transcription. *Mol Cell Biol* 27, 7475-7485.
- Walisko, O., Schorn, A., Rolfs, F., Devaraj, A., Miskey, C., Izsvak, Z., and Ivics, Z. (2008). Transcriptional activities of the Sleeping Beauty transposon and shielding its genetic cargo with insulators. *Mol Ther* 16, 359-369.
- Wang, H., Rosidi, B., Perrault, R., Wang, M., Zhang, L., Windhofer, F., and Iliakis, G. (2005). DNA ligase III as a candidate component of backup pathways of nonhomologous end joining. *Cancer Res* 65, 4020-4030.

- Wang, Y., Dawson, V.L., and Dawson, T.M. (2009). Poly(ADP-ribose) signals to mitochondrial AIF: a key event in parthanatos. *Exp Neurol* 218, 193-202.
- Wang, Y., Kim, N.S., Haince, J.F., Kang, H.C., David, K.K., Andrabi, S.A., Poirier, G.G., Dawson, V.L., and Dawson, T.M. (2011). Poly(ADP-ribose) (PAR) binding to apoptosis-inducing factor is critical for PAR polymerase-1-dependent cell death (parthanatos). *Sci Signal* 4, ra20.
- Wang, Z., Michaud, G.A., Cheng, Z., Zhang, Y., Hinds, T.R., Fan, E., Cong, F., and Xu, W. (2012). Recognition of the iso-ADP-ribose moiety in poly(ADP-ribose) by WWE domains suggests a general mechanism for poly(ADP-ribosyl)ation-dependent ubiquitination. *Genes Dev* 26, 235-240.
- Wang, Z.Q., Stingl, L., Morrison, C., Jantsch, M., Los, M., Schulze-Osthoff, K., and Wagner, E.F. (1997). PARP is important for genomic stability but dispensable in apoptosis. *Genes Dev* 11, 2347-2358.
- Watkins, N.J., and Bohnsack, M.T. (2012). The box C/D and H/ACA snoRNPs: key players in the modification, processing and the dynamic folding of ribosomal RNA. *Wiley Interdiscip Rev RNA* 3, 397-414.
- Yamada, M., Ohkawara, B., Ichimura, N., Hyodo-Miura, J., Urushiyama, S., Shirakabe, K., and Shibuya, H. (2003). Negative regulation of Wnt signalling by HMG2L1, a novel NLK-binding protein. *Genes Cells* 8, 677-684.
- Yan, Q., Xu, R., Zhu, L., Cheng, X., Wang, Z., Manis, J., and Shipp, M.A. (2013). BAL1 and its partner E3 ligase, BBAP, link Poly(ADP-ribose) activation, ubiquitylation, and double-strand DNA repair independent of ATM, MDC1, and RNF8. *Mol Cell Biol* 33, 845-857.
- Yelamos, J., Schreiber, V., and Dantzer, F. (2008). Toward specific functions of poly(ADP-ribose) polymerase-2. *Trends Mol Med* 14, 169-178.
- Young, L.C., McDonald, D.W., and Hendzel, M.J. (2013). Kdm4b Histone Demethylase Is a DNA Damage Response Protein and Confers a Survival Advantage following gamma-Irradiation. *The Journal of biological chemistry* 288, 21376-21388.
- Yu, M., Schreek, S., Cerni, C., Schamberger, C., Lesniewicz, K., Poreba, E., Vervoorts, J., Walsemann, G., Grotzinger, J., Kremmer, E., *et al.* (2005). PARP-10, a novel Myc-interacting protein with poly(ADP-ribose) polymerase activity, inhibits transformation. *Oncogene* 24, 1982-1993.
- Yu, M., Zhang, C., Yang, Y., Yang, Z., Zhao, L., Xu, L., Wang, R., Zhou, X., and Huang, P. (2011). The interaction between the PARP10 protein and the NS1 protein of H5N1 AIV and its effect on virus replication. *Virol J* 8, 546.
- Yu, S.W., Wang, H., Poitras, M.F., Coombs, C., Bowers, W.J., Federoff, H.J., Poirier, G.G., Dawson, T.M., and Dawson, V.L. (2002). Mediation of poly(ADP-ribose) polymerase-1-dependent cell death by apoptosis-inducing factor. *Science* 297, 259-263.
- Yu, W., Ginjala, V., Pant, V., Chernukhin, I., Whitehead, J., Docquier, F., Farrar, D., Tavoosidana, G., Mukhopadhyay, R., Kanduri, C., *et al.* (2004). Poly(ADP-ribosyl)ation regulates CTCF-dependent chromatin insulation. *Nat Genet* 36, 1105-1110.

- Zahradka, P., and Ebisuzaki, K. (1982). A shuttle mechanism for DNA-protein interactions. The regulation of poly(ADP-ribose) polymerase. *Eur J Biochem* *127*, 579-585.
- Zampieri, M., Guastafierro, T., Calabrese, R., Ciccarone, F., Bacalini, M.G., Reale, A., Perilli, M., Passananti, C., and Caiafa, P. (2012). ADP-ribose polymers localized on Ctfp-Parp1-Dnmt1 complex prevent methylation of Ctfp target sites. *Biochem J* *441*, 645-652.
- Zampieri, M., Passananti, C., Calabrese, R., Perilli, M., Corbi, N., De Cave, F., Guastafierro, T., Bacalini, M.G., Reale, A., Amicosante, G., *et al.* (2009). Parp1 localizes within the Dnmt1 promoter and protects its unmethylated state by its enzymatic activity. *PLoS One* *4*, e4717.
- Zardo, G., and Caiafa, P. (1998). The unmethylated state of CpG islands in mouse fibroblasts depends on the poly(ADP-ribosyl)ation process. *The Journal of biological chemistry* *273*, 16517-16520.
- Zhang, C., Comai, L., and Johnson, D.L. (2005). PTEN represses RNA Polymerase I transcription by disrupting the SL1 complex. *Mol Cell Biol* *25*, 6899-6911.
- Zhang, Y., Liu, S., Mickanin, C., Feng, Y., Charlat, O., Michaud, G.A., Schirle, M., Shi, X., Hild, M., Bauer, A., *et al.* (2011). RNF146 is a poly(ADP-ribose)-directed E3 ligase that regulates axin degradation and Wnt signalling. *Nat Cell Biol* *13*, 623-629.
- Zhao, J., Yuan, X., Frodin, M., and Grummt, I. (2003). ERK-dependent phosphorylation of the transcription initiation factor TIF-IA is required for RNA polymerase I transcription and cell growth. *Mol Cell* *11*, 405-413.
- Zhou, J., Hu, G., and Wang, X. (2010). Repression of smooth muscle differentiation by a novel high mobility group box-containing protein, HMG2L1. *J Biol Chem* *285*, 23177-23185.
- Zhu, Y., and Gao, G. (2008). ZAP-mediated mRNA degradation. *RNA Biol* *5*, 65-67.