



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Dissection of DNA damage responses using multiconditional genetic interaction maps

Guénolé, A.

Citation

Guénolé, A. (2013, June 25). *Dissection of DNA damage responses using multiconditional genetic interaction maps*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/21009>

Version: Corrected Publisher's Version

License: [Licence agreement concerning inclusion of doctoral thesis in the Institutional Repository of the University of Leiden](#)

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/21009>

Note: To cite this publication please use the final published version (if applicable).

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/21009> holds various files of this Leiden University dissertation.

Author: Guérolé, Aude

Title: Dissection of DNA damage responses using multiconditional genetic interaction maps

Issue Date: 2013-06-25

RESUME EN FRANCAIS

L'information génétique nécessaire à la production de composants cellulaires et à leur organisation est fixée dans nos gènes. Il est donc important, pour que toutes cellules du corps fonctionnent correctement, que leur information génétique reste intacte. Divers agents physiques et chimiques dans notre environnement (comme les rayonnements UV du soleil) ou des entités chimiques (tels que les espèces réactives de l'oxygène) générés par les processus métaboliques dans nos cellules endommagent la molécule support de l'information génétique, l'ADN. Ces dommages de l'ADN peuvent conduire à des mutations. Hors, l'accumulation d'erreurs (ou mutations) dans notre ADN peut amener une cellule à se diviser de manière incontrôlée et donc à devenir cancéreuse. Par conséquent, pour éviter ces effets néfastes, les cellules déclenchent une série de mécanismes de défense lors de l'induction de dommages de l'ADN. Ces mécanismes de défense sont collectivement appelés réponses aux dommages de l'ADN (ou DNA damage response-DDR-en anglais). Le DDR coordonne l'activité des différentes voies de réparation de l'ADN avec la progression du cycle cellulaire afin de promouvoir l'élimination efficace et précise des lésions de l'ADN. Cependant, alors que bon nombre des facteurs clés impliqués dans le DDR ont été identifié et caractérisé, notre point de vue actuel sur les interactions entre les différents facteurs et les processus impliqués dans le DDR est limité. L'objectif de cette thèse est donc d'améliorer notre compréhension de ce programme de protection crucial. Pour atteindre cet objectif, nous avons utilisé une approche de criblage génétique à haut débit appelé Epistatic MiniArray profiling (EMAP). Cette technique permet de mesurer les interactions épistatiques (positives) et synergiques (négatives) entre des paires de gènes. Afin de savoir si ces interactions entre gènes changent lors de l'induction de certains types de lésions de l'ADN, nous avons généré des EMAPs sous trois conditions induisant différents types de lésions dans l'ADN. Ces réseaux d'interactions génétiques ont révélé de nombreuses interactions entre gènes déjà connus ou nouveaux lorsque les cellules sont exposées à des agents endommageant l'ADN. Nous avons utilisé des approches génétiques, biochimiques et microscopiques afin d'explorer le rôle de certains de ces gènes (et interactions) dans les réponses aux dommages de l'ADN.

Dans le chapitre 2, nous décrivons le principe de l'EMAP, une technologie que nous avons développé pour pouvoir mesurer des interactions génétiques dans des conditions normales ainsi qu'en présence de différents agents endommageant l'ADN. Nous montrons que notre EMAP multi-conditionnelle est une ressource très utile pour révéler les facteurs et voies de signalisations impliqués dans le DDR. Cette technique a permis de retrouver des éléments connus du DDR mais elle en a aussi mis en évidence de nouveaux. Ainsi, nous avons constaté que la camptothécine (CPT), un agent qui provoque des cassures double-brins (CDB) lors de la réplication de l'ADN, augmente les interactions des gènes impliqués dans la réparation des CDB. D'autre part, le métyl méthanesulfonate (MMS), une drogue qui provoque des dommages des bases de l'ADN et le blocage des fourches de réplication, augmente les interactions des gènes impliqués dans les mécanismes de réparation post-réplcatifs (RPR). Ces résultats valident la qualité de nos données. Et surtout, nous avons démontré que ce type de criblage est statistiquement plus puissant pour révéler des associations entre agents endommageant l'ADN et voies de réparations que les criblages de sensibilité ou analyse de profile d'expression fait avec des simples mutants. De façon remarquable, les trois agents qui endommagent l'ADN de manières distinctes, induisent chacun un ensemble unique d'interactions génétiques. Ceci suggère que les lésions produites par chaque agent

A
p
p
e
u
d
i
x

déclenchent une DDR très spécifique. Seulement quelques interactions génétiques ont été trouvés dans le réseau commun, c'est à dire induit par les trois agents. Nous avons choisi de poursuivre l'étude de quatre séries de nouvelles interactions génétiques. Nous présentons ces résultats dans les chapitres 3 à 6.

Dans le chapitre 3, nous décrivons l'identification des interactions génétiques entre *RTT109*, une histone H3 acétyltransférase, et les gènes codant pour des composants de l'une des polymérase de synthèse translésionnelle (TLS) Pol ζ . Ces observations nous ont amené à tester si *Rtt109* affecte le contournement mutagène des lésions de l'ADN par les polymérase TLS. En effet, nous avons constaté que la perte de *Rtt109* entraîne une diminution du taux de mutations générées par les polymérase TLS après l'exposition des cellules à la lumière UV. L'analyse des spectres de mutations induits par les UV (au niveau du gène *CAN1*) et les taux de mutation dans les souches défectueuses soit pour *Rtt109* ou pour l'une des polymérase TLS ou les deux suggèrent que *Rtt109* affecte la synthèse translésionnelle médiée par Pol ζ et Pol η . Ainsi, nous avons identifié *Rtt109* comme un nouveau facteur qui régule le contournement mutagène des lésions de l'ADN effectué par différentes polymérase TLS.

Dans le chapitre 4, nous avons constaté que deux gènes, *RUB1* et *UBC12*, qui codent pour des éléments clés de la machinerie de neddylation chez la levure, montrent de fortes interactions négatives avec de nombreux gènes signalant la présence de dommages dans l'ADN (ou gène du checkpoint des dommages de l'ADN), comme *RAD17*, *DDC1*, *RAD9* et *RAD24*, en réponse aux lésions induites par la CPT. Ainsi, nous avons étudié le rôle du mécanisme de neddylation dans le contrôle du checkpoint des dommages de l'ADN. Nous avons non seulement constaté que la perte de neddylation conduit à des perturbations dans la progression du cycle cellulaire en présence de CPT, mais aussi augmente l'instabilité du génome dans les cellules déficientes en checkpoint. La neddylation est un processus par lequel les protéines sont modifiées par l'attachement d'un peptide appelé Rub1. Les cibles principales du processus de neddylation sont les Cullin RING ubiquitine ligases (CRL). Elles sont responsables de la dégradation de protéines impliquées dans de nombreux processus cellulaires. Pour explorer davantage comment le processus de neddylation pourrait affecter la réponse cellulaire aux dommages de l'ADN induits par CPT, nous avons regardé s'il cible des protéines impliquées dans le DDR. De façon intéressante, nous avons constaté que la neddylation a un impact sur les niveaux de protéines non-LCR comme *Mms22* et *Nhp10*, deux protéines impliquées dans le contrôle du cycle cellulaire et la réparation de l'ADN. Ainsi, nous proposons que la neddylation régule les niveaux protéiques de facteurs impliqués dans la DDR et par conséquent affecte réparation de l'ADN, le contrôle du cycle cellulaire et la stabilité du génome.

Nous avons montré que les interactions génétiques induites par chaque agent endommageant l'ADN sont très spécifiques (chapitre 2). Cela suggère qu'un ensemble unique de voies de la DDR est déclenché en fonction du type de lésion induit dans l'ADN. Cependant, nous avons également constaté un nombre important de changements dans les interactions génétiques qui ont été induites par au moins deux des composés génotoxiques. Nous avons appelé cette intersection entre les réseaux génétiques: le réseau DDR commun. Le réseau commun comprend non seulement plusieurs facteurs connus de la DDR, mais révèle également des gènes non-caractérisés comme *IRC21*. Le chapitre 5 décrit l'identification et la caractérisation de *Irc21* comme un nouveau facteur impliqué dans la réponse aux dommages

de l'ADN. Nous avons montré que l'absence de *IRC21* non seulement supprime la sensibilité des mutants du checkpoint à la CPT et au MMS, mais aussi leur instabilité génomique, leurs défauts de progression dans le cycle cellulaire et de réparation de l'ADN. En outre, nous avons observé que la perte de *IRC21* rend les cellules hypersensibles au MMS lorsqu'il est combiné avec la rapamycine, un inhibiteur de TOR. La rapamycine est un composé qui peut conduire à une augmentation et une diminution de l'abondance de protéines (par la voie de l'autophagie). Ceci suggère que *Irc21* peut affecter la DDR en régulant l'abondance de certaines protéines de la DDR.

Le chapitre 6 rapporte sur l'interaction négative (MMS et CPT-induite) entre le gène de réparation de l'ADN, *SAE2* et un gène codant pour une phosphatase, *PPH3*. Nous avons tenté de comprendre comment ce facteur de réparation de l'ADN et la protéine phosphatase interagissent pour coordonner la signalisation et la réparation des dommages à l'ADN. Nous avons constaté que les cellules déficientes pour *SAE2* et *PPH3* présentent de graves défauts de signalisation des lésions de l'ADN (checkpoint). Par ailleurs, la réparation des lésions de l'ADN, induites par le MMS, est altérée dans ces cellules doubles mutantes, tandis que la réparation des cassures double brins (CDB) induites par une nucléase se fait normalement, au contraire des cellules simple mutante pour *SAE2*. Nous proposons que la coopération entre *Sae2* et *Pph3* est importante pour la réparation de l'ADN et l'activation du checkpoint en réponse aux lésions induites par le MMS, mais est dispensable pour la réparation des CDB.

En conclusion, notre criblage génétique multi-conditionnel s'est avérée être une méthode extrêmement puissante pour mettre en évidence les interconnexions entre les facteurs ou les voies de signalisation qui régulent les réponses cellulaires à divers types de dommages de l'ADN. Les études fonctionnelles de ces interactions génétiques permettront de comprendre le rôle de nouveaux facteurs dans les mécanismes impliqués dans la DDR. Étant donné que la DDR est hautement conservée de la levure à l'homme, nous prévoyons que notre carte d'interactions génétiques informera également sur la DDR humaine et ses maladies associées.

*A
p
p
e
n
d
i
x*