

SOPHIE LACHAPELLE

**IDENTIFICATION DE NOUVEAUX
PARTENAIRES PROTÉIQUES DE LA PROTÉINE
WERNER**

Mémoire présenté
à la Faculté des études supérieures de l'Université Laval
dans le cadre du programme de Biologie cellulaire et moléculaire
pour l'obtention du grade de Maître ès Sciences (M.Sc.)

DÉPARTEMENT DE BIOLOGIE CELLULAIRE ET MOLÉCULAIRE
FACULTÉ DE MÉDECINE
UNIVERSITÉ LAVAL
QUÉBEC

2011

© Sophie Lachapelle, 2011

Résumé

Le syndrome de Werner est caractérisé par un vieillissement prématuré. Au niveau cellulaire, nous observons une instabilité chromosomique importante et une sénescence accélérée comparé à des cellules normales. Le gène muté (*WRN*) responsable de ce syndrome code pour une protéine possédant un domaine exonucléase et hélicase à ADN impliqués dans la réplication de l'ADN, la réparation et la transcription. Toutefois, nous ne savons toujours pas laquelle de ses fonctions est responsable du vieillissement prématuré. Nous pensons que l'identification de nouvelles protéines interagissant directement avec la protéine WRN pourrait nous donner des réponses. Des analyses par spectrométrie de masse sur l'immunoprécipitation de la protéine WRN ont permis d'identifier la protéine ribosomale RPS3 et plusieurs autres comme nouveaux partenaires potentiels. Plusieurs approches biochimiques furent utilisées afin de confirmer l'interaction directe entre WRN et RPS3. Nous avons démontré que RPS3 interagit directement avec la protéine WRN *in vitro*. Des études additionnelles sont requises pour comprendre la fonction de ce complexe *in vivo*.

Avant-propos

L'exécution de ce mémoire n'aurait pas été possible sans l'accueil du Dr Michel Lebel dans son laboratoire. Il m'a permis de m'impliquer dans les recherches de son laboratoire en me proposant un projet rempli de défis et de possibilités. J'ai aussi eu l'opportunité d'apprendre des techniques diversifiées et d'expandre davantage mes connaissances en recherche fondamentale. Les résultats que j'ai pu obtenir grâce à mes manipulations, mais aussi grâce à l'aide de personnes extrêmement compétentes telles que Dr Jean-Philippe Gagné, Dr Jean-Yves Masson, Chantal Garand, Yan Coulombe, Myriam Desbiens et Dr Guy Poirier, ont mené à la soumission d'un article pour : *Journal of proteome research* au mois de septembre 2010. Le manuscrit a été accepté et publié en janvier 2011.

Ma contribution pour ce projet fût principalement de participer à l'élaboration et l'exécution des diverses immunoprécipitations qui ont mené à l'exécution de plusieurs figures dont les figures 1C, 1D, 2, 3, 4A et 4B. Ces immunoprécipitations permettaient de générer le matériel nécessaire pour l'analyse par spectrométrie de masse, en plus de confirmer l'interaction des nouveaux partenaires avec les protéines endogènes. Je profite de l'occasion pour remercier le Dr Jean-Philippe Gagné pour son aide à la mise au point du protocole d'immunoprécipitation. Je veux aussi le remercier pour les techniques de microscopie qui ont permis la localisation cellulaire de la protéine WRN à l'état normal et sous condition de bris à l'ADN. Je remercie le Dr Jean-Yves Masson et M. Yan Coulombe qui ont réalisé les tests exonucléase et hélicase à partir de mes immunoprécipitations. J'ai aussi participé à la figure 4D, en réalisant une technique de chromatographie d'affinité avec la protéine WRN purifiée. Ma contribution pour les résultats de l'article est donc de plus de 50%. Je tiens à remercier ma collègue Myriam Desbiens pour la réalisation de la chromatographie d'affinité avec la protéine RPS3 purifiée.

Finalement, je remercie ma famille, mon conjoint et mes amis (es) pour leur appui et leur confiance en ma réussite. Je tiens à partager ce succès avec eux et je leur serai toujours redevable pour ce soutien si important.

Table des matières

Résumé.....	ii
Avant-propos.....	iii
Table des matières.....	iv
Liste des abréviations.....	vi
Liste des tableaux.....	viii
Liste des figures.....	x
Chapitre I.....	1
Introduction.....	1
<u>1.1 Mise en contexte</u>	2
<u>1.2 Syndrome de Werner</u>	2
1.2.1 Historique.....	3
1.2.2 Symptômes et diagnostic.....	3
1.2.3 Incidence de la maladie.....	5
1.2.4 Le gène codant pour la protéine WRN.....	6
<u>1.3 La protéine WRN</u>	6
1.3.1 Hélicases.....	7
1.3.2 Exonucléases.....	9
<u>1.4 Fonctions potentielles de la protéine WRN</u>	10
1.4.1 Localisation cellulaire.....	12
1.4.2 WRN dans la réplication de l'ADN.....	12
1.4.3 WRN dans les sentiers de réparation de l'ADN.....	14
1.4.3.1 Réparation par jonction d'extrémités non-homologues (NHEJ).....	14
1.4.3.2 Réparation par la recombinaison homologue.....	16
1.4.3.3 WRN dans la maintenance des télomères.....	18
1.4.3.4 La réparation par excision de bases (REB).....	22
1.4.4 WRN dans les sentiers modifiés par p53.....	24
<u>1.5 Hypothèses et objectifs de l'étude</u>	25
Chapitre II.....	27
Résultats.....	27
Résumé de l'article.....	28
Proteome-wide Identification of WRN-Interacting Proteins in Untreated and Nuclease-Treated Samples.....	29
Abstract.....	30
<u>2.1 Introduction</u>	31
<u>2.2 Material and methods</u>	33
2.2.1 Cell Line and Expression Vectors.....	33
2.2.2 eYFP-WRN Immunoprecipitation.....	33
2.2.3 Exonuclease and Helicase Activities of Immunoprecipitated eYFP-WRN.....	34
2.2.4 LC_MS/MS Analysis.....	34
2.2.5 Interpretation of Tandem MS Spectra.....	35
2.2.6 Criteria for Protein Identification.....	35
2.2.7 Immunoblotting.....	36
2.2.8 Bioinformatic Tool for Protein Network Analysis.....	37
2.2.9 Evaluation of Protein Domain and Family Distribution.....	37
2.2.10 Live Cell Imaging and Laser Microirradiation.....	37

<u>2.3 Results</u>	38
2.3.1 Identification of WRN-Interacting Proteins by Mass Spectrometry.....	38
2.3.2 Identification of WRN-Interacting Proteins in DNA and RNA Depleted Cell Extracts by Mass Spectrometry Analysis	43
2.3.3 Validation of the Proteomic Analyses by Western Analysis of Specific WRN Interactants in Untreated and Nuclease-Treated Immunoprecipitations.....	47
2.3.4 Validation of RPS3 Interactions with Endogenous WRN	49
<u>2.4 Discussion</u>	51
Chapitre III.....	56
Discussion.....	56
Bibliographie.....	63

Liste des abréviations

8-oxodG: lésions de type 8-déoxyguanosine
 ALT: cellules «Alternative lengthening of telomeres»
 APE1: «Apurinic/aprimidinic endonuclease 1»
 ATM: «Ataxia Telangiectasia Mutated»
 ATP: Adénosine triphosphate
 ATR: «ATM and Rad3 Related»
 B-23 or NPM1: «nucleophosmin»
 BLM: protéine Bloom
 BRCA1: «Breast cancer susceptibility protein 1»
 complexe MRN: complexe MRE11-RAD50-Nbs1
 CPT: Camptothécine
 D-loop: structure de boucle
 DMEM: «Dulbecco's Modified Eagle Medium»
 DNA Pol_β: Polymérase à ADN bêta
 DNA Pol_δ: polymérase à ADN delta
 DNA-PK: «DNA-dependent protein kinase»
 DNA-PKcs: Large sous-unité catalytique de DNA-PK
E. Coli: Escherichia coli
 EGFP: «Enhance Green Fluorescence Protein»
 ERK1/2 : La protéine kinase «Extracellular signal-regulated kinases»
 ES MS/MS: «electrospray tandem masse spectrometry»
 EYFP : «Enhance Yellow Fluorescence Protein»
 EYFP-WRN: WRN couplée à la protéine EYFP
 FEN1: protéine Flap Endonucléase 1
 HEK: « human embryonic kidney cell »
 LAP2A: «lamina-associated polypeptide 2-alpha»
 LP-REB: «long-patch» Réparation par Excision de Base de plusieurs nucléotides
 MRE11: «meiotic recombination 11»
 NAD: «_nicotinamide adenine dinucleotide»
 nanoLC: nanoscale capillary liquid chromatography
 Nbs1: «Nijmegen breakage syndrome 1»
 NEIL1: «Endonuclease VIII-Like 1»
 NHEJ: réparation par jonction des extrémités non-homologues
 OGG1: «8-oxoguanine glycosylase»
 p21Waf1: «cyclin-dependent kinase inhibitor 1»
 PARP1: poly(ADP-ribose) polymérase 1
 PCNA: «Proliferating Cell Nuclear Antigen»
 POT1: «Protection Of Telomeres 1»
 REB: réparation par excision de bases
 RH: Réparation par recombinaison homologue

RI: Radiations Ionisantes

RP: «reversed-phase»

RPA: «Replicative Protein A»

RPS3: Protéine ribosomale S3

RQC: «RecQ conserved»

S BLM: Syndrome de Bloom

SLN: signal de localisation nucléaire

SP1: «Specificity Protein 1»

SP-REB: «short-patch repair» réparation par excision de bases qui retire une ou quelques bases

SV40: *Simian virus 40*

SW : Syndrome de Werner

Terc: gène codant pour un composant ARN de la télomérase

TERT: Télomérase, qui contient l'ARN télomérase et la transcriptase inverse

Topo1: Topoisomérase 1

TRF1 et TRF2: «Telomere repeat binding Factors 1 and 2»

X4L4: complexe ligase XRCC4 à ADN IV

Liste des tableaux

Chapitre I

Tableau 1. Critères cliniques servant à diagnostiquer le syndrome de Werner.

Tableau 2. Protéines interagissant avec WRN (physiquement et/ou fonctionnellement).

Chapitre II

Tableau 1. List of Proteins Previously Identified or Predicted in the Literature to Interact with WRN.

Tableau 2. List of WRN-Interacting Proteins Identified by Mass Spectrometry Using Benzoylserine and RNase A in the Lysis Buffer.

Tableau 3. Significant Statistical Biological Functions Associated with Proteins Identified by LC_MS/MS in eYFP-WRN Immunoprecipitates Treated with Nucleases As Revealed by PANTHER.

Les tableaux supplémentaires sont disponibles sur le site internet puisque leur format et la quantité d'information ne conviennent pas aux critères d'impression

<http://pubs.acs.org/doi/suppl/10.1021/pr100990s>

Tableau supplémentaire 1:

Complete unfiltered mass spectrometry data (peptides were established at >95% probability and whole protein identifications were established at >95 % probability).

Tableau supplémentaire 2a:

Complete list of identified proteins by LC-MS/MS in the eYFP-WRN immunoprecipitate but not in the eYFP immunoprecipitate.

Tableau supplémentaire 2b:

List of all proteins identified by LC-MS/MS in the eYFP-WRN immunoprecipitate (without nuclease pre-treatments) with at least 2 unique peptides.

Tableau supplémentaire 2c:

List of all proteins identified by LC-MS/MS in the eYFP-WRN immunoprecipitate (with nuclease treatments).

Tableau supplémentaire 3:

List of nuclear proteins identified by LC-MS/MS in the eYFP-WRN immunoprecipitate (no nuclease was used in the lysis buffer).

Tableau supplémentaire 4:

List of WRN-associated nuclear proteins categorized based on their functional domains.

Tableau supplémentaire 5:

List of WRN-interacting nuclear proteins identified by mass spectrometry (Benzonase and RNase A were added to the lysis buffer prior to the immunoprecipitations).

Liste des figures

Chapitre I

Figure 1. Protéine Werner (WRN) schématisée illustrant les 5 domaines de la protéine.

Figure 2. Schéma des différents substrats entrepris par la protéine WRN.

Figure 3. Différents substrats pris en charge par la fonction exonucléase de WRN.

Figure 4. Différents partenaires de WRN classés selon leur domaines d'implication principaux dans la cellule.

Chapitre II

Figure 1. Cellular and enzymatic activities of the eYFP-WRN protein

Figure 2. Co-immunoprecipitation of proteins from cells transfected with eYFP or eYFP-WRN constructs

Figure 3. Co-immunoprecipitation of selected proteins with the eYFP-WRN construct

Figure 4. Interaction of RPS3 with the WRN protein

Chapitre I
Introduction

1.1 Mise en contexte

Selon Statistique Canada, l'espérance de vie dans la population canadienne ne cesse d'augmenter depuis le dernier siècle. Elle est passée de 62 ans en 1931 à 83 ans en 2006. Bien que cette nouvelle soit positive, plusieurs incidences de maladies importantes découlent d'une population qui vit de plus en plus longtemps. En effet, vivre plus vieux ne signifie pas nécessairement de vivre en parfaite santé.

Le vieillissement est considéré comme étant le principal facteur de risques pour plusieurs déclin fonctionnels au niveau physiologique [Avila-Funes et al., 2008; Stuck et al., 1999]. Le vieillissement est visuellement perceptible par plusieurs signes physiques évidents tels que l'apparition de cheveux gris, par une posture plus courbée attribuable aux accumulations de dommages aux articulations. De plus, il est démontré que le vieillissement augmente le risque d'apparition de maladies invalidantes voire mortelles, telles que le cancers, le diabète, les maladies neurodégénératives, la démence, l'affaiblissement de la structure osseuse et les infections diverses [Farrelly, 2008].

Au niveau cellulaire, de nombreuses modifications ont également lieu. Dans le vieillissement normal, on trouve une accumulation de dommages à l'ADN, un raccourcissement des télomères, accroissement du stress oxydatif et une augmentation de la sénescence cellulaire [Berlett and Stadtman, 1997; Finkel and Holbrook, 2000; Hayflick, 1965; Misteli and Soutoglou, 2009]. Quoique ces phénomènes soient étudiés depuis un moment, les sentiers les plus touchés et les mécanismes en cause ne sont pas bien connus. Ce qui m'amène à vous parler d'un modèle très intéressant pour étudier le vieillissement : Le Syndrome de Werner.

1.2 Syndrome de Werner

Le Syndrome de Werner (SW) est une maladie génétique autosomale caractérisée par le vieillissement prématuré de l'individu atteint.

1.2.1 Historique

L'ophtalmologiste allemand Otto Werner a été le premier à décrire ses observations de plusieurs signes du vieillissement précoce, telles que la sclérose de la peau et les cataractes juvéniles bilatérales chez les membres d'une même famille [Werner, 1904]. À partir de ses observations, M. Werner suggéra l'hypothèse que l'ensemble de ces maladies chez un même individu forment un syndrome ayant un mode de transmission familiale ou héréditaire. Des études effectuées plusieurs années plus tard confirmèrent ce statut de syndrome héréditaire avec un mode de transmission génétique autosomal [Agatson and Gartner, 1939; Epstein et al., 1966; Oppenheimer and Kugel, 1934; Oppenheimer and Kugel, 1941; Thannhauser, 1945]. En 1981, une étude réalisée sur quarante-deux familles japonaises est venue réaffirmer la transmission autosomale d'un gène simple sous des traits récessifs du SW [Goto et al., 1981]. Plus tard, des études indiquèrent que le SW est causé par la mutation d'un gène situé sur un bras du chromosome 8 (8p11-12) chez l'humain [Goto et al., 1992]. Enfin, le gène muté responsable du SW a été cloné et il fut démontré qu'il code pour une protéine appartenant à une famille d'hélicases à ADN [Yu et al., 1996].

1.2.2 Symptômes et diagnostic

Les phénotypes cliniques du SW rejoignent grandement ceux qui ont été décrits plus tôt pour le vieillissement normal. Ce qui distingue le SW est l'apparition des symptômes à un âge considérablement précoce. L'apparition des cheveux gris commence généralement vers l'adolescence ou le début de l'âge adulte. Ces phénotypes sont accompagnés d'un arrêt de croissance au cours de la même période. Les individus atteints sont donc d'une plus petite stature que la moyenne. Vers le milieu de la vingtaine, on observe des changements au niveau de la peau et de la voix. On note également l'apparition d'ulcères de la peau vers le début de la trentaine, et du diabète de type II vers le milieu de la même décennie [Epstein et al., 1966]. Les patients souffrant de ce syndrome décèdent généralement vers l'âge moyen de 50 ans, à la suite de complications liées au cancer ou à des problèmes cardiovasculaires [Epstein et al., 1966; Goto, 1997; Salk, 1982]. Les patients atteints du SW peuvent aussi avoir des désordres d'ordre immunitaire ainsi que des troubles au niveau du tissu conjonctif, du système métabolique-endocrine et du système nerveux [Goto, 1997;

Goto and Kato, 1995; Goto et al., 1989; Goto and Nishioka, 1989; Goto et al., 1992; Goto et al., 1982; Kakehi et al., 1988; Shiraki et al., 1998; Sumi, 1985].

Le SW a aussi des impacts au niveau cellulaire. En effet, il a été démontré que les fibroblastes provenant de patients atteints du SW entrent en sénescence beaucoup plus rapidement en culture que des cellules provenant de personnes saines du même âge [Baird et al., 2004; Martin et al., 1970; Salk et al., 1985]. Ces mêmes cellules affichent aussi une prolongation de la phase S [Poot et al., 1992]. De plus, plusieurs anomalies chromosomiques sont observables, telles que des translocations, des délétions et des inversions [Salk et al., 1981]. L'incidence de recombinaisons homologues augmente de façon marquée, et on note des aberrations dans la recombinaison mitotique de certaines lignées cellulaires de patients atteints du SW [Cheng et al., 1990; Prince et al., 2001]. Les cellules provenant de patients souffrant du SW sont tout particulièrement sensibles à plusieurs agents endommageant l'ADN et sont caractérisées par un niveau élevé de mutations de type délétion spontanée [Fukuichi et al., 1989].

Il est parfois difficile de poser un diagnostic de SW chez un patient, puisque les symptômes les plus distinctifs mettent un certain temps à apparaître et leur niveau de sévérité diffèrent d'un individu à l'autre. Afin de permettre l'établissement d'un diagnostic clinique, un ensemble de critères cliniques et un système de marques ont été établis par le «Werner Syndrome International Registry» [Kudlow et al., 2007]. Ces critères cliniques (voir tableau 1) peuvent aussi être accompagnés d'une approche davantage moléculaire, servant à identifier les mutations les plus répandues dans le gène de *WRN* ou la perte de la protéine en soi. Cette dernière approche permet de confirmer ou d'exclure le diagnostic du SW [Huang et al., 2006; Uhrhammer et al., 2006].

Tableau 1. Critères cliniques servant à diagnostiquer le syndrome de Werner.

<p>Signes cardinaux et symptômes (apparaissent à partir de 10 ans)</p> <ul style="list-style-type: none"> • Cataractes (bilatérales) • Pathologies dermatologiques caractéristiques (peau mince, peau atrophique, altérations pigmentaires, ulcérations, hyperkératinisation, atrophie sous-cutanée régionale) et forme du visage caractéristique (visage de type «oiseau») • Petite stature • Consanguinité parentale (3^e cousin ou supérieur) ou enfants affectés • Blanchiment et rareté des cheveux • Résultat positif au test urinaire d'acide hyaluronique de 24 heures
<p>Signes ultérieurs et symptômes</p> <ul style="list-style-type: none"> • Diabète mellitus • Hypogonadisme (sous-développement sexuel secondaire, fertilité diminuée, atrophie testiculaire ou ovarienne) • Ostéoporose • Ostéoporose des phalanges distales des doigts et/ou des orteils (diagnostic par radiographie) • Calcification des tissus mous • Évidences d'athérosclérose prématurée • Néoplasmes méenchymales, néoplasmes rares ou néoplasmes multiples • Changements dans la voix (ton aigu, grinçant ou rauque) • Résultat positif au test urinaire d'acide hyaluronique de 24 heures • Pieds plats
<p>Établissement du diagnostic</p> <ul style="list-style-type: none"> • <u>Définitif</u> : tous les signes cardinaux et deux des signes ultérieurs. • <u>Probable</u> : les trois premiers signes cardinaux et deux parmi les autres signes. • <u>Possible</u> : soit des cataractes ou des altérations dermatologiques et n'importe lequel des quatre autres signes. • <u>Exclusion</u> : apparition de signes et de symptômes avant l'adolescence (excepté pour la stature).

1.2.3 Incidence de la maladie

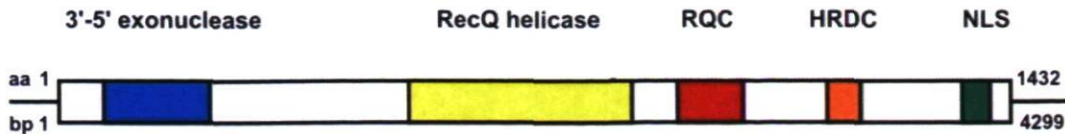
Le SW n'est pas très répandu lorsque toute la population mondiale est considérée. En effet, seulement 1 cas sur 20 000 000 personnes est observé [Epstein et al., 1966]. Cependant dans la population japonaise, on retrouve un taux considérablement plus élevé de cas soit 1 sur 100 000 habitants [Epstein et al., 1966] et de façon encore plus importante dans certaines régions particulières du Japon. D'ailleurs, la plupart des cas diagnostiqués à l'extérieur du Japon ont des ancêtres japonais [Goto, 1997]. La seule exception est un petit noyau de population se trouvant en Italie, à la Sardaigne.

1.2.4 Le gène codant pour la protéine WRN

Il y a une trentaine de mutations qui ont été identifiées dans le gène *WRN* et qui peuvent causer le SW chez des individus homozygotes [Matsumoto et al., 1997; Ozgenc and Loeb, 2005]. Jusqu'à maintenant, tout indique que ces dernières mènent à une protéine WRN tronquée pouvant avoir perdu jusqu'à 1256 acides aminés incluant invariablement le signal de localisation nucléaire (SLN) en C-terminal [Matsumoto et al., 1997]. En effet, plusieurs mutants ont été générés et fusionnés avec un peptide fluorescent «Enhance Green Fluorescence Protein» (EGFP) permettant ainsi de localiser les mutants dans des modèles cellulaires et de constater qu'aucun des mutants n'était en mesure de se rendre au noyau, pas même la EGFP seule [Matsumoto et al., 1997]. Puisqu'il s'agit d'une maladie récessive, les deux copies doivent se retrouver inactivées par des mutations comme des codons stop insérés au mauvais endroit, des décalages du cadre de lecture et des insertions/délétions. Apparemment, ces mutations rendent impossible toute détection de la protéine WRN et affecteraient la stabilité de celle-ci [Moser et al., 1999].

1.3 La protéine WRN

Il est intéressant de constater que cet important désordre n'est causé que par des mutations retrouvées sur un seul gène situé à la position chromosomique 8p12 [Goto et al., 1992; Yu et al., 1996]. Le gène de *WRN*, aussi connu sous le nom de *RECQ3*, produit un polypeptide simple de 162 kDa contenant 1432 acides aminés au total [Huang et al., 1998]. La protéine WRN est une hélicase qui utilise l'Adénosine triphosphate (ATP) comme source d'énergie pour ouvrir certaines structures d'ADN double brin dans la direction 3' _ 5' [Gray et al., 1997; Shen et al., 1998; Suzuki et al., 1997] décrite plus loin dans ce texte. Elle possède aussi une composante exonucléase en N-terminal procédant 3' _ 5' [Huang et al., 1998]. (voir figure 1)



[Hu et al., 2005]

Figure 1. La protéine WRN possède différents domaines composés de la façon suivante : de l'acide aminé 78 à 219 se trouve le domaine exonucléase, de l'acide aminé 569 à 859 se trouve le domaine RecQ hélicase un domaine probable d'activation de la transcription se situe entre les acides aminés 315 à 403 et le domaine de signalisation de localisation nucléaire (SLN) entre les acides aminés 1370 et 1375 (révisé dans [Fry, 2002]). Le domaine HRDC, quant à lui, jouerait un rôle distinctif dans les fonctions de WRN impliquant des interactions protéine-protéine [Kitano et al., 2007]. Finalement, le domaine RQC est possiblement un domaine important pour les interactions protéine-protéine. Cependant, plusieurs caractérisations restent encore à être faites pour les domaines HRDC et RQC.

1.3.1 Hélicases

Tout organisme produit plusieurs types d'hélicases. Ces enzymes sont capables d'ouvrir les brins complémentaires de structures d'acides nucléiques utilisant l'ATP comme source d'énergie (révisé dans [Hanada and Hickson, 2007]). L'activité des différentes hélicases est décrite par leur vitesse, leur processivité et leur directionnalité (révisé dans [Abdelhaleem]2010). La protéine WRN possède une activité hélicase ATP-dépendante [Huang et al., 1998; Shen et al., 1998]. Elle possède aussi un motif «RecQ conserved» (RQC), la classifiant comme l'un des membres de la famille des hélicases de type RecQ (révisé dans [Bachrati and Hickson, 2003]). Cette famille a été nommée d'après la protéine qui porte le nom de RecQ chez *Escherichia coli*. Une étude a démontré que la protéine RecQ chez *E. Coli* a pour fonction d'empêcher les erreurs dans les mécanismes de recombinaison de l'ADN [Hanada et al., 1997]. La famille des hélicases de type RecQ a été hautement conservée au cours de l'évolution que ce soit au niveau des procaryotes ou des mammifères. Chez l'homme, au moins cinq membres de cette famille sont connus dont la

protéine WRN [Ellis et al., 1995; Kitao et al., 1998; Puranam and Blackshear, 1994; Seki et al., 1994]. Quelques-unes de ces hélicases sont mieux connues pour les troubles cliniques qu'une ou des mutations dans leur gène respectif peuvent causer. Il y a le syndrome de Bloom, le syndrome de Rothmund-Thompson et dans le cas de la protéine qui nous intéresse le SW. Des évidences cellulaires et biochimiques suggèrent que ces hélicases de type RecQ sont impliquées dans la réplication de l'ADN, la réparation de l'ADN, la recombinaison et la maintenance des télomères [Cobb and Bjergbaek, 2006; Hanada and Hickson, 2007; Lee et al., 2005; Ouyang et al., 2008]. Elles sont capables d'ouvrir des duplex ADN-ADN ou des duplex ADN-ARN [Yu et al., 1996].

L'hydrolyse de l'ATP conduite par l'activité hélicase 3' _ 5' de WRN démontre une processivité relativement pauvre sur les longs duplexes d'ADN et n'est capable d'ouvrir que des courts duplex d'ADN en l'absence de cofacteurs auxiliaires (ex. Mg^{2+}) [Brosh et al., 1999; Gray et al., 1997; Suzuki et al., 1997]. L'une des caractéristiques démontrée de WRN est qu'elle est en mesure de prendre en charge différents types de substrats qui pourraient potentiellement interférer avec quelques processus cellulaires tels que la réplication et la transcription [Ozgenç and Loeb, 2005]. En somme, les substrats de la fonction hélicase de WRN sont différents intermédiaires de la réplication, recombinaison et réparation de l'ADN incluant, entre autres, les jonctions d'Holliday et des structures de duplexe en fourche, en plus d'être en mesure de séparer des complexes ADN-ARN (révisé dans [Brosh and Bohr, 2002; Mohaghegh and Hickson, 2001])[Suzuki et al., 1999] (voir figure 2).

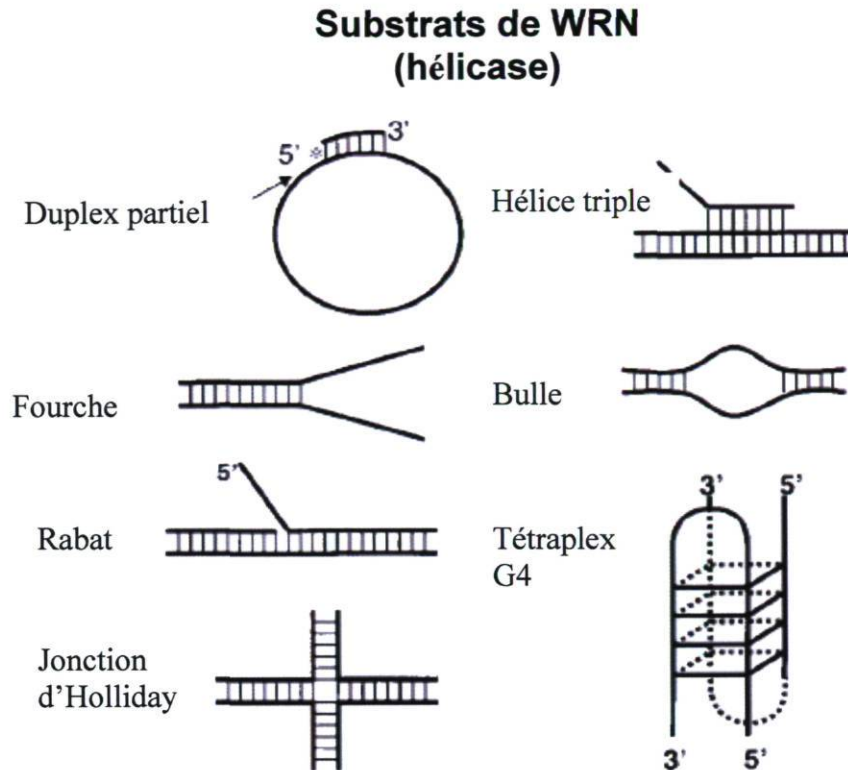


Figure 2. Schéma des différents substrats entrepris par la protéine WRN.

1.3.2 Exonucléases

La protéine WRN possède une caractéristique qui la distingue des autres RecQ-hélicases, elle possède aussi une activité exonucléase. L'activité exonucléase de la protéine WRN est totalement indépendante physiquement et fonctionnellement de son activité hélicase [Ozgenç and Loeb, 2005]. Cette activité est de polarité 3' → 5' et n'est pas dépendante de l'ATP, mais elle est augmentée par la présence de cette dernière molécule [Kamath-Loeb et al., 1998]. La réaction génère des produits 5'-déoxynucléosides monophosphate [Kamath-Loeb et al., 1998]. Son substrat privilégié est le brin récessif d'un duplex partiel d'ADN qui termine par un groupement 3'-OH ou 3'-PO₄ [Kamath-Loeb et al., 1998]. De plus, elle digère efficacement l'ADN n'ayant qu'un seul mauvais appariement de nucléotide en 3'-terminal, mais ne dégrade pas l'ADN ayant deux mauvais appariements de nucléotide en 3'-terminal pas plus qu'elle n'hydrolyse les simples brins d'ADN [Kamath-Loeb et al., 1998] (voir figure 3). Une étude plus récente a démontré que WRN interagit physiquement

et fonctionnellement avec un facteur du mécanisme de réparation par jonction des extrémités non-homologues (NHEJ), c'est-à-dire le complexe ligase XRCC4 à ADN IV (X4L4) qui stimule spécifiquement l'activité exonucléase de cette première, mais pas son activité hélicase [Singh et al., 2009].

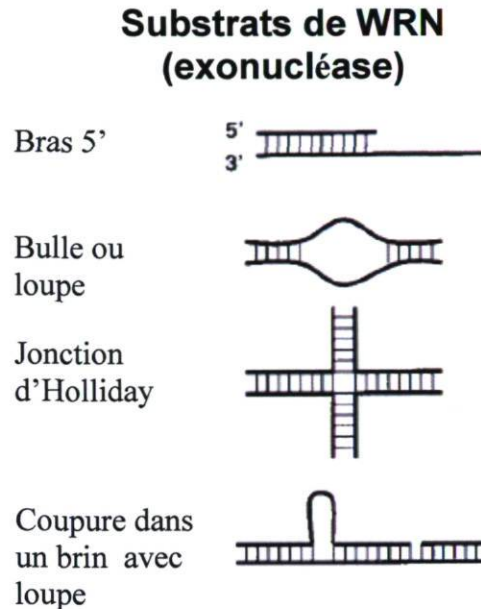


Figure 3. Différents substrats pris en charge par la fonction exonucléase de WRN.

Même si les deux principales activités de WRN sont en mesure de fonctionner indépendamment l'une de l'autre, des études récentes ont démontré qu'elles pourraient agir de concert pour retirer un long brin d'ADN d'un duplexe en fourche qui ne peut être complètement pris en charge uniquement par la portion hélicase elle-même [Opresko et al., 2001]. Ces études suggèrent donc que les fonctions exonucléase et hélicase pourraient agir de façon coordonnée pour inhiber l'apparition d'intermédiaires anormaux de la recombinaison lors de la réparation de l'ADN. [Opresko et al., 2001].

1.4 Fonctions potentielles de la protéine WRN

Plusieurs protéines interagissant avec WRN ont déjà été identifiées. Elles interviennent dans la maintenance de l'intégrité du génome cellulaire et dans la réponse aux dommages à l'ADN. Il n'est pas simple de discerner les fonctions précises de WRN avec cette variété de

partenaires, mais certains des rôles joués par celle-ci sont déjà bien décrits. Dans un tableau inspiré d'un article publié par l'équipe du Dr Vilhelm A. Bohr, quelques-uns de ses partenaires sont nommés.

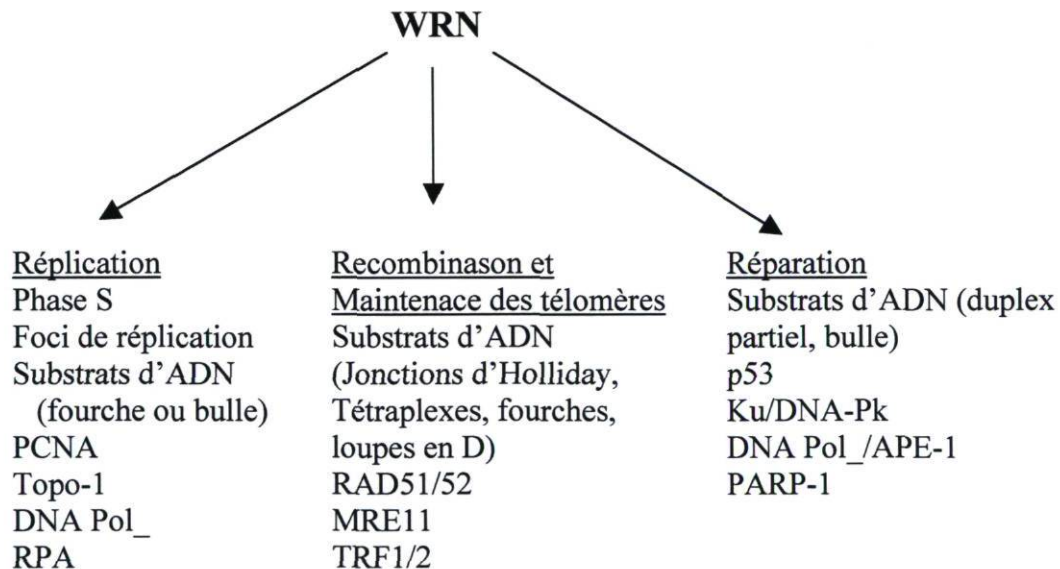
Tableau 2. Protéines interagissant avec WRN (physiquement et/ou fonctionnellement)

Protéines interagissant avec WRN	Interaction physiquement et/ou fonctionnelle
RPA	Stimule l'activité hélicase de WRN.
FEN-1	WRN stimule l'activité de clivage des rabats de FEN-1.
p53	Les cellules SW présentent une diminution de l'apoptose régulée par p53. Une surexpression de WRN affecte la transcription régulée par p53. p53 inhibe la fonction exonucléase de WRN.
Pol_	WRN recrute la sous-unité p50 de Pol_ aux nucléoles.
Topo 1	WRN stimule l'activité topoisomérase.
PCNA	Inconnue
Ku 70/80	Stimule l'activité exonucléase de WRN.
DNA-PK	Module négativement les activités hélicase et exonucléase de WRN par la phosphorylation de cette dernière. Interagit physiquement avec DNA-PKcs.
WHIP	Interagit génétiquement dans la levure avec <i>sgs1</i> .
SUMO-1	Inconnue
BLM	Inhibe la fonction exonucléase de WRN.
Protéine Kinase A	Régule la distribution nucléaire de WRN.
TRF2	Stimule la fonction hélicase de WRN.
Pol_	WRN stimule le déplacement de Pol_ sur le brin pendant la synthèse de l'ADN.

[Opresko et al., 2003]

1.4.1 Localisation cellulaire

La protéine WRN endogène se situe dans le noyau et elle est en plus grande abondance dans les nucléoles que dans le nucléoplasme chez les cellules humaines [Marciniak et al., 1998]. Des études de localisation de la protéine WRN ont établi qu'elle se situe dans les régions nucléaires, où la transcription est particulièrement active, incluant les nucléoles. La protéine WRN se trouve aussi là où la réplication prend place, donc au niveau de la fourche de réplication et là où la réparation de l'ADN se produit, donc au niveau des foyers d'ADN endommagé. Finalement, WRN se situe aussi aux sites potentiels du métabolisme des télomères [Opresko et al., 2003]. Ces observations suggèrent que WRN agit à plusieurs niveaux par rapport au métabolisme de l'ADN en général (voir figure 4).



[Ozgenç and Loeb, 2005]

Figure 4. Différents partenaires de WRN classés selon leur domaine d'implication principal dans la cellule.

1.4.2 WRN dans la réplication de l'ADN

Plusieurs séries de preuves cellulaires et biochimiques supportent le fait que la protéine WRN joue un rôle dans la réplication de l'ADN. En effet, les lignées cellulaires déficientes

en protéine WRN entrent plus rapidement en sénescence, présentent une phase S prolongée et possèdent une fréquence réduite de sites d'initiation de la réplication [Martin et al., 1970; Poot et al., 1992; Salk et al., 1985]. C'est notamment l'interaction fonctionnelle et physique entre WRN et d'autres protéines essentielles pour la réplication de l'ADN qui indiquent que WRN y est potentiellement impliqué. WRN interagit avec la «Replicative Protein A» (RPA). Cette protéine est composée de trois sous-unités et a été originalement purifiée de cellules infectées par le *Simian virus 40 (SV40)*. Cet hétérodimère est nécessaire pour la réplication de l'ADN viral [Wold, 1997]. En plus de son rôle dans la réplication virale, RPA est requise pour la réplication de l'ADN chromosomal [Dornreiter et al., 1992]. Une étude récente indique que RPA est aussi impliquée dans le mécanisme de réparation par excision de base de plusieurs nucléotides (LP-REB) [DeMott et al., 1998]. L'activité hélicase de la protéine WRN requiert la participation de RPA pour supporter son activité sur de longs duplex d'ADN [Brosh et al., 1999]. Une interaction physique a d'ailleurs été démontrée entre les deux protéines [Brosh et al., 1999]. Cette interaction démontre que WRN est potentiellement impliquée dans la réplication et la réparation de l'ADN. En accord avec les résultats cités ci-haut, des interactions avec d'autres protéines de la réplication d'ADN sont aussi connues pour WRN. En effet, des immunoprécipitations de WRN démontrent qu'il y a une interaction avec la protéine Topoisomérase 1 (Topo1) [Lebel et al., 1999]. Cette dernière est une enzyme qui contrôle la structure topologique de l'ADN en générant des coupures temporaires. Elle joue un rôle essentiel, entre autres, dans la réplication de l'ADN en permettant l'ajout ou le retrait de supertours dans la molécule d'ADN. En plus de coprécipiter ensemble, WRN stimule l'activité de Topo1 par une liaison directe entre les deux protéines [Laine et al., 2003].

La protéine «Proliferating Cell Nuclear Antigen» (PCNA) est une composante importante du complexe multiprotéique de réplication et tout particulièrement de la fourche de réplication [Lebel et al., 1999]. Tout comme Topo1, elle co-immunoprécipite avec la protéine WRN, indiquant ainsi la présence d'une interaction entre les deux protéines, qui est d'ailleurs directe (protéine-protéine) donc sans aucun intermédiaire [Lebel et al., 1999]. Les deux protéines colocalisent au niveau des foyers de réplication [Rodriguez-Lopez et al., 2003]. Une interaction entre PCNA et la protéine du SW est intéressante puisque la

première est un point de communication potentiel entre une variété importante de processus d'intérêts pour la cellule tels que le contrôle du cycle cellulaire, la réplication de l'ADN, la recombinaison de l'ADN et la réparation [Jonsson and Hubscher, 1997; Lebel et al., 1999].

La principale polymérase à ADN, la polymérase à ADN delta (DNA Pol δ), interagit physiquement et fonctionnellement avec la protéine WRN [Opresko et al., 2003]. Cette coopération entre les deux protéines a été démontrée par la technique des deux hybrides [Szekely et al., 2000]. À l'aide de la technique d'immunoprécipitation, il a été possible de démontrer l'association de WRN au centre dimérique actif (les sous-unités p50 et p125) de la DNA Pol δ [Szekely et al., 2000]. L'addition de la protéine WRN, dans un essai d'extension d'oligonucléotides simple utilisant la protéine DNA pol δ , permet d'augmenter son efficacité [Kamath-Loeb et al., 2000]. Cependant, cette dernière ne stimule ni l'activité hélicase, ni l'activité exonucléase de WRN [Chen and Oshima, 2002; Kamath-Loeb et al., 2000]. De plus, l'interaction entre WRN et la DNA pol δ aurait pour fonction, selon toutes évidences, de réduire les blocages durant la synthèse d'ADN [Opresko et al., 2003] Cette autre interaction protéine-protéine appuie l'hypothèse de la participation active de la protéine WRN dans la réplication de l'ADN.

1.4.3 WRN dans les sentiers de réparation de l'ADN

Les interactions décrites ci-haut indiquent que la protéine WRN est impliquée dans la réplication de l'ADN. Toutefois, la protéine WRN joue aussi un rôle important dans divers mécanismes de réparation de l'ADN, car elle interagit aussi avec des protéines impliquées dans la réparation. Les différents mécanismes de réparation, dont il est question, sont les mécanismes de réparation par jonction des extrémités non-homologues (NHEJ), de recombinaison homologue (RH), de maintenance des télomères et le mécanisme de réparation par excision de bases (REB).

1.4.3.1 Réparation par jonction d'extrémités non-homologues (NHEJ)

Le mécanisme de réparation par jonction d'extrémités non-homologues (NHEJ) est un sentier de réparation des bris double brin de l'ADN. Le terme «non-homologues» fait

référence au fait que le processus de réparation ne nécessite pas de patron homologue, mais qu'il s'agit plutôt de joindre les extrémités libres d'ADN brisé. La protéine WRN interagit aussi avec des protéines critiqueusement impliquées dans le NHEJ [Opresko et al., 2003]. Il s'agit notamment de l'hétérodimère Ku70/86 et du complexe « DNA-dépendant protein kinase » (DNA-PK) [Opresko et al., 2003]. DNA-PK fait partie de la famille des kinases à sérine/thréonine et est composée d'une large sous-unité catalytique (DNA-PKcs) et de l'hétérodimère Ku, qui lie spécifiquement l'ADN brisé [Opresko et al., 2003; Ozgenc and Loeb, 2005]. Le complexe DNA-PK participe à la réparation des bris de double brin d'ADN causés par le stress oxydatif physiologique, la recombinaison, les radiations ionisantes autant que les substances chimiques génotoxiques [Featherstone and Jackson, 1999]. Le déficit, de l'une ou l'autre de ces deux composantes, mène entre autres à une sensibilité accrue aux radiations ionisantes (RI) attribuable à la défectuosité du mécanisme de réparation effectué par le NHEJ résultant en bris double brin dans l'ADN (révisé dans [Smith and Jackson, 1999]). D'ailleurs, deux études ont démontré que des fibroblastes provenant de patients atteints du SW manifestent une sensibilité légère mais significative aux RI en comparaison avec des fibroblastes contrôles ou des fibroblastes SW transfectés avec l'ADNc de WRN normal [Saintigny et al., 2002; Yannone et al., 2001].

L'interaction entre WRN et les composantes du complexe DNA-PK a été démontrée dans plusieurs laboratoires, par des techniques de liaison par affinité et par co-immunoprécipitation [Cooper et al., 2000; Li and Comai, 2000]. En conditions normales, l'hétérodimère Ku est en mesure de lier autant la partie N- que C- terminal de WRN [Karmakar et al., 2002b]. La liaison de l'hétérodimère Ku stimule la fonction 3'→5' exonucléase de WRN non seulement en augmentant sa fonctionnalité, mais aussi en augmentant le nombre de substrats pouvant être dégradé par cette fonction de WRN [Cooper et al., 2000; Karmakar et al., 2002a; Li and Comai, 2000]. Des études récentes démontrent que WRN est en mesure d'interagir aussi directement avec DNA-PKcs et ce, sans l'implication de l'hétérodimère Ku [Yannone et al., 2001]. De plus, la phosphorylation de WRN par DNA-PKcs inhibe les fonctions hélicase et exonucléase de WRN. Ce processus peut être renversé par la liaison de l'hétérodimère Ku [Yannone et al., 2001]. En somme, la réparation de bris d'ADN serait initiée par Ku 70/86. Les terminaisons seraient

alors prises en charge par une combinaison de protéines en mesure d'ouvrir les brins et de faire une dégradation. Ceci pourrait donc impliquer la protéine WRN [Opresko et al., 2003]. Finalement, Ku70/86 recruterait DNA-PKcs et ainsi le complexe DNA-PK actif serait en mesure de contrôler la dégradation effectuée par WRN en régulant négativement son activité exonucléase [Opresko et al., 2003].

La protéine WRN interagit avec un autre complexe majeur du NHEJ, c'est-à-dire le complexe XRCC4/Ligase IV (X4L4) [Kusumoto et al., 2008]. Dans la réparation par NHEJ, le rôle de X4L4 est d'être recrutée aux extrémités libres d'ADN et de pratiquer la ligation [Kusumoto et al., 2008]. Une étude récente a démontré, par co-immunoprécipitation, qu'il y a une association entre WRN, XRCC4 et la ligase IV [Kusumoto et al., 2008]. Le complexe X4L4 (et non XRCC4 seul) stimule l'activité exonucléase de la protéine WRN uniquement. Finalement, l'étude a fait la preuve que X4L4 lie les brins d'ADN en présence de Ku. Ce dernier stimule l'activité de la ligase, pendant le retrait de quelques nucléotides non complémentaires de la terminaison d'ADN par WRN [Kusumoto et al., 2008].

1.4.3.2 Réparation par la recombinaison homologue

Un autre mécanisme important de réparation de l'ADN est celui de la recombinaison homologue. Il permet de maintenir la stabilité chromosomique, en plus de participer à la réparation de bris d'ADN double brin. La recombinaison peut avoir lieu dans des conditions basales de la cellule que ce soit lors de la recombinaison V(D)J, durant la réplication méiotique ou mitotique de l'ADN. Elle peut aussi être induite en situation de stress comme lors de l'exposition à des agents qui endommagent l'ADN [Opresko et al., 2003]. Lors de la recombinaison, il se peut que le mécanisme de réparation bloque à différentes étapes ce qui peut occasionner des bris double brin ou des intermédiaires de recombinaison bloqués [Michel, 2000]. Afin que la réplication puisse être relancée, ces situations doivent absolument être résolues et WRN participerait à la réparation par recombinaison homologue pour y arriver [Kuzminov, 1999; Michel, 2000]. WRN jouerait un rôle au niveau de la fourche de réplication bloquée [Brosh and Bohr, 2002].

WRN fonctionnerait dans la résolution d'intermédiaires de la recombinaison homologue, notamment, dans celles dépendantes de RAD51 [Prince et al., 2001; Saintigny et al., 2002]. Lorsque des cellules sont traitées avec de la Camptothécine (CPT), qui est une drogue utilisée dans le traitement du cancer en inhibant l'action de la topoisomérase de type I, il est possible d'observer une colocalisation entre WRN, RAD51 et RPA [Sakamoto et al., 2001]. RAD51 fonctionne avec RPA pour enrober et stabiliser un simple brin d'ADN en vue d'une activité d'échange de brins d'ADN dans les étapes précoces de la recombinaison [Sakamoto et al., 2001].

De façon évidente, WRN augmenterait l'efficacité de l'appariement de brins d'ADN complémentaires d'une séquence double brin modulée par RAD52, tandis que cette dernière inhibe ou stimule l'activité hélicase de WRN d'une manière dépendante de la structure de l'ADN [Baynton et al., 2003]. La protéine RAD52 est aussi importante pour le recrutement de RAD54. D'ailleurs, il a aussi été démontré que WRN colocalise avec RAD54, qui est une autre protéine clé, impliquée dans le mécanisme de réparation par recombinaison homologue en réponse au stress réplicatif [Otterlei et al., 2006]. La protéine RAD54 participe au remodelage de la chromatine lors de la réparation des bris d'ADN.

La protéine «Nijmegen breakage syndrome 1» (Nbs1), qui fait partie des protéines essentielles au mécanisme de réparation par RH, n'a pas de fonction enzymatique connue. Celle-ci est cependant nécessaire aux activités exonucléase et endonucléase optimales du complexe MRE11 et à la bonne localisation nucléaire des protéines «meiotic recombination 11» (MRE11) et RAD50 [Carney et al., 1998; Paull and Gellert, 1999]. Une étude a démontré que WRN s'associe avec le complexe MRE11-RAD50-Nbs1 (complexe MRN) et ce, par l'intermédiaire de Nbs1 [Cheng et al., 2004]. La «Breast cancer susceptibility protein 1» (BRCA1) interagit, elle aussi, avec le complexe MRN et la protéine RAD51 pour participer à la réparation de bris double brin d'ADN [Dong et al., 2003; Scully et al., 1997; Zhong et al., 1999]. En lien avec ces informations, une interaction physique et fonctionnelle entre la protéine BRCA1 et WRN, où BRCA1 stimulerait la fonction hélicase de WRN a été démontrée [Cheng et al., 2006].

Lorsqu'un bris double brin survient en phase S de la réplication de l'ADN, des protéines ont le rôle de signaler le dommage afin de recruter notamment les protéines dont il a été question jusqu'à maintenant. Ce signal est régulé, entre autres, par les protéines kinases «Ataxia Telangiectasia Mutated» (ATM) et «ATM and Rad3 Related» (ATR) [Abraham, 2001]. La protéine WRN interagit avec ATM et ATR dans la phase S et colocalise avec ATM pendant cette même phase [Cheng et al., 2008]. Jusqu'à maintenant, l'association entre WRN et la phase S, dépend de la présence de bris double bin de l'ADN [Rossi et al.]. La protéine WRN est phosphorylée d'une façon ATM et/ou ATR dépendante suite aux dommages associés à l'arrêt de la phase S [Cheng et al., 2008].

Une autre hélicase de la famille des RecQ, la protéine «Bloom» (BLM), intervient dans la recombinaison homologe au niveau des fourches de réplication bloquées [Thompson and Schild, 2002]. D'ailleurs les patients atteints du syndrome de Bloom (S BLM), dont l'hélicase du même nom n'est pas fonctionnelle, présentent une augmentation d'échanges entre chromatides soeurs lesquelles sont des marques de recombinaisons anormales dans l'ADN [German, 1993]. Des études ont démontré que WRN et BLM interagissent ensemble par des techniques de co-immunoprécipitation et de colocalisation [von Kobbe et al., 2002]. Il est connu que BLM a un effet négatif sur la fonction exonucléase de WRN, mais la coopération des deux protéines par rapport à leur activité hélicase n'est pas déterminée [von Kobbe et al., 2002]. WRN pourrait donc résoudre certains intermédiaires de la recombinaison en association avec RPA, RAD51, BLM et possiblement avec d'autres protéines non identifiées pour le moment [Opresko et al., 2003].

1.4.3.3 WRN dans la maintenance des télomères

1.4.3.3.a Structure des Télomères

Afin d'éviter la perte d'information génétique importante attribuable à l'érosion des chromosomes lors de la réplication, les cellules possèdent des structures que l'on nomme télomères [Blackburn, 1984]. Les télomères sont des composants nucléoprotéiques qui sont situés aux extrémités des chromosomes afin d'éviter que ces derniers ne soient perçus

comme des bris d'ADN [Rossi et al.]2010]. C'est une région non-codante de l'ADN. Chez les mammifères, les télomères sont composés de doubles brins d'ADN de séquences répétées en tandem, TTAGGG, suivi par un court brin d'ADN 3' cohésif qui envahit la région double brin pour former une structure de boucle (D-loop) [Griffith et al., 1999]. L'étendue de la longueur du double brin télomérique varie d'environ 10 kb chez l'humain à 100 kb chez la souris [Blackburn, 2001; Greider and Blackburn, 1996]. Les protéines de liaison spécifiques aux télomères et leurs protéines associées protègent l'ADN télomérique à la terminaison des chromosomes tout en formant un complexe [de Lange, 2002]. Celui-ci inclut des protéines en mesure de lier l'ADN double brin, les «Telomere repeat binding Factors 1 and 2» (TRF1 et TRF2). La protéine TRF1 est aussi impliquée dans la régulation négative de la longueur des télomères et dans la régulation du fuseau mitotique. TRF2, quant à elle, est impliquée dans la maintenance et le recrutement d'autres facteurs protéiques au niveau des télomères. Il y a aussi une protéine liant l'ADN simple brin télomérique saillant qui est la protéine «Protection Of Telomeres 1» (POT1). Cette protéine est essentielle pour la réplication des terminaisons chromosomiques. Le complexe contient aussi les protéines associées à TRF1, TRF2 et POT1, c'est-à-dire : Rap1, TIN2 et TPP1 [de Lange, 2002]. Faisant également partie du complexe, il y a la télomérase, qui contient l'ARN télomérase et la transcriptase inverse (TERT). C'est une autre composante des télomères qui permet de maintenir la longueur de ces structures [Greider and Blackburn, 1996; Wai, 2004]. La TERT est absente dans plusieurs cellules chez l'adulte. D'ailleurs, les télomères raccourcissent avec l'âge, l'inflammation et le stress.

1.4.3.3.b La maintenance des télomères

Plusieurs protéines participant aux points de contrôle de réparation/réplication de l'ADN s'associent avec les protéines du complexe télomérique [Rossi et al.]2010]. Ces protéines incluent ATM, ATR, des nucléases et des hélicases à ADN (comme WRN ou BLM), des protéines du RH, NHEJ ou du REB [Brosh and Bohr, 2007]. Plusieurs de ces protéines sont activement impliquées dans la maintenance de la longueur des télomères [Brosh and Bohr, 2007]. La protéine WRN est l'une des hélicases RecQ connue pour participer à cette maintenance. En effet, WRN interagit fonctionnellement et physiquement avec les protéines impliquées dans la protection de l'ADN télomérique, c'est-à-dire TRF1, TRF2 et

Pot1 [Opresko et al., 2005; Opresko et al., 2004; Opresko et al., 2002]. WRN interagit avec MRE11, RAD50 et Nbs1 (voir plus tôt dans ce texte) qui sont des protéines aussi associées avec TRF2 [Cheng et al., 2006]. En outre, WRN interagit fonctionnellement avec Ku, qui elle interagit avec les deux, TRF1 et TRF2 [Orren et al., 2001]. Des résultats, autres que des interactions protéiques, suggèrent fortement la participation de WRN dans différentes activités reliées aux télomères. En effet, il y a une absence du phénotype représentatif du SW humain chez les souris déficientes en protéine WRN et possédant de longs télomères [Rudolph, 1999]. Cela pourrait impliquer la condition des télomères dans la pathogenèse du SW. Une étude utilisant un modèle de souris double mutantes *-/-* pour le gène *Terc* (codant pour un composant ARN de la télomérase) et pour *WRN* a démontré qu'après l'épuisement de la réserve de longs télomères, dans les générations tardives, il est possible d'obtenir un phénotype semblable à celui retrouvé chez les patients humains atteints du SW. Ces souris démontrent des caractéristiques de vieillissement prématuré telles que le grisonnement hâtif, l'ostéoporose, le diabète de type II et les cataractes. De plus, les cellules en culture provenant de ce modèle de souris entrent en sénescence plus rapidement, présentent une accumulation de foyers d'ADN endommagé et ont une instabilité chromosomique marquée [Chang et al., 2004].

1.4.3.3.c La réplication des Télomères

L'une des implications importantes de WRN, par rapport à ses interactions avec des facteurs télomériques, est sa participation dans la réplication des télomères. Quoique WRN se localise de façon prédominante au niveau des nucléoles dans les lignées cellulaires humaines positives pour la télomérase. Cependant, il existe un type de lignée cellulaire capables de maintenir la longueur de leurs télomères à partir d'un mécanisme indépendant de la télomérase. On nomme ces cellules «Alternative lengthening of telomeres» (ALT). Dans ces dernières, une fraction significative de WRN colocalise avec TRF2 et TRF1 au niveau de l'ADN télomérique des lignées cellulaires humaines [Opresko et al., 2004; Opresko et al., 2002]. Ceci suggère une participation de WRN dans la réplication de l'ADN télomérique.

Pour que la réplication de l'ADN télomérique ait lieu, il doit y avoir dissociation des structures D-loop. Des études *in vitro* démontrent que WRN est en mesure de défaire ce genre de structures et donc de libérer le brin envahissant, tout en étant régulé par TRF1 et TRF2 [Opresko et al., 2004]. Dans le même sens, l'activité hélicase de WRN sur les structures en D-loop télomériques est stimulée par une interaction physique avec la protéine TRF2 [Opresko et al., 2002]. Inversement, l'activité exonucléase de WRN se retrouve limitée par les protéines TRF1 et TRF2 [Opresko et al., 2004]. La protéine télomérique POT1 stimule, elle aussi, le déroulement des structures en D-loop par la protéine WRN en maintenant les brins sous leur forme séparée [Opresko et al., 2005; Sowd et al., 2008]. La protéine WRN joue aussi un rôle très important pour redémarrer les fourches de réplication télomérique à l'arrêt, suite à un dommage à l'ADN [Rossi et al.]2010]. De façon plus importante, WRN stimule l'activité de la protéine Flap Endonucléase 1 (FEN1) pour cliver les brins 5' non déroulés *in vitro* et les deux protéines colocalisent aux foyers de PCNA après l'induction d'une fourche de réplication bloquée au niveau des télomères *in vivo* [Sharma et al., 2004]. De plus, la formation de structures en G4 (voir figure 2) est une autre forme susceptible de provoquer l'arrêt de la réplication télomérique du brin envahissant. Cette structure est préférentiellement prise en charge par WRN, parmi les autres substrats, et peut donc prévenir l'arrêt de la réplication induite par une structure d'ADN en G4 [Kamath-Loeb et al., 2001].

1.4.3.3.d Réparation de l'ADN télomérique

WRN interagit physiquement avec POT1 et l'hétérodimère Ku70/86, lesquelles jouent un rôle crucial dans la protection des télomères contre les recombinaisons homologues aberrantes [Celli et al., 2006; Wu et al., 2006]. En plus de la réparation par recombinaison homologue, WRN est impliquée dans la réparation des dommages oxydatifs à l'ADN télomérique [Opresko, 2008]. Les espèces réactives d'oxygène comme les ions organiques et inorganiques d'oxygène, les radicaux libres et les peroxydes sont les plus importants contributeurs aux dommages à l'ADN [Castro and Freeman, 2001]. Ces espèces sont régulièrement générées dans les cellules à travers des processus variés, incluant des expositions chimiques exogènes et endogènes et des radiations ionisantes [Ghosh et al., 2009]. Le génome est fréquemment attaqué par les espèces réactives d'oxygène ce qui

génère différents types de lésions et mène à des bris d'ADN. Des mutations découlent de ces bris d'ADN. Les séquences répétées de triple guanines rendent l'ADN télomérique enclin aux dommages oxydatifs, dont des lésions de type 8-déoxyguanosine (8-oxodG) [Rossi et al.]2010]. Ce type de lésion est très stable. Plusieurs études associent le raccourcissement des télomères aux dommages oxydatifs à l'ADN [Newman et al., 2008; Satoh et al., 2008]. Les dommages oxydatifs à l'ADN sont pris en charge par le REB et tout porte à croire que WRN interagit avec d'autres protéines importantes du même processus (voir section qui suit). La protéine POT1, qui interagit avec WRN, est en mesure de lier autant les structures en D-loop, qu'elles soient endommagées ou non. De plus, il a été démontré récemment que WRN interagit avec les structures en D-loop contenant des 8-oxodG et même qu'elle est en mesure de les dérouler de façon encore plus efficace que les structures en D-loop non-endommagées [Ghosh et al., 2009]. Malgré ces résultats très intéressants, beaucoup d'études restent à être réalisées pour décrire le rôle du REB, ainsi que le rôle de la protéine WRN dans la réparation de l'ADN télomérique.

1.4.3.4 La réparation par excision de bases (REB)

La réparation par excision de base (REB) est un mécanisme cellulaire de réparation de l'ADN endommagé à travers le cycle cellulaire. Ce mécanisme est principalement responsable de retirer les petites lésions de bases non déformantes de l'hélice du génome. Les bases simples d'ADN peuvent être endommagées par divers mécanismes tels que l'alkylation, l'oxydation ou la déamination, empêchant ainsi la capacité de la base endommagée de faire son lien hydrogène entre les bases azotées de l'ADN [Opresko et al., 2003]. Les cellules provenant de patients atteints du SW sont particulièrement sensibles au stress oxydatif, suggérant la participation de la protéine WRN dans le REB [Von Kobbe et al., 2004b]. Il existe deux formes de REB, la «short-patch repair» (SP-REB) qui retire une ou quelques bases et la «long-patch repair» (LP-REB) qui retire plusieurs nucléotides sur un même site endommagé. WRN interagit avec des partenaires qui interviennent soit dans l'un ou l'autre de ces processus [Rossi et al.]2010]. L'ADN glycosylase est l'enzyme qui induit la réparation par REB. Une enzyme est donc nécessaire pour hydrolyser le lien glycosylique qui lie la base endommagée au phosphate désoxyribose du squelette d'ADN et ce sont les glycosylases qui détiennent ce rôle important [Stivers and Jiang, 2003]. Il existe

différentes enzymes appartenant à cette famille pouvant intervenir sur les lésions d'ADN. Bien qu'aucune étude ne démontre une interaction entre la glycosylase majeure chez l'humain, la «8-oxoguanine glycosylase» (OGG1) et la protéine WRN, cette dernière interagit de façon *in vivo* et *in vitro* avec un autre membre de la même famille, la protéine «Endonuclease VIII-Like 1» (NEIL1) [Das et al., 2007; Rossi et al.]2010]. NEIL1 est une glycosylase humaine qui prend en charge les lésions formamido-pyridine lors d'un stress oxydatif et en accord avec cette information, les cellules déficientes en WRN présentent une accumulation de ce type de lésions [Das et al., 2007; Imoto et al., 2006].

Une autre protéine, qui est très importante dans le REB et qui est associée à WRN, est la protéine «Apurinic/apyrimidinic endonuclease 1» (APE1). Cette endonucléase, qui a pour rôle d'inciser les sites abasiques durant le REB, inhibe WRN [Ahn et al., 2004]. Différentes expérimentations ont d'ailleurs démontré que WRN est en mesure de former un complexe stable avec la protéine APE1 [Ahn et al., 2004]. Il est proposé, dans la littérature, que le rôle de cette association permettrait à APE1 d'éviter le déroulement imprécis de certains intermédiaires du REB par WRN jusqu'à ce que la DNA Pol γ soit recrutée pour la synthèse et le déplacement sur le brin d'ADN [Ahn et al., 2004].

L'enzyme poly(ADP-ribose) polymérase 1 (PARP1) est l'enzyme responsable de la poly(ADP-ribosyl)ation, une modification post-traductionnelle importante lors des dommages à l'ADN. PARP1 se lie rapidement aux bris simple ou double brin de l'ADN à partir de son domaine de liaison à l'ADN en N-terminal. Elle utilise le « γ -nicotinamide adenine dinucleotide» (NAD) pour synthétiser les poly(ADP-ribose) sur une variété de protéines incluant p53, topoisomérase, histones et sur PARP1 lui-même [Burkle, 2001]. De plus, PARP1 vise et régule, via le poly(ADP-ribose), les fonctions de protéines impliquées dans les points de contrôle des dommages à l'ADN ou dans la réparation de l'ADN [Burkle, 2001]. Des études ont démontré qu'une déficience en PARP1 ou une altération dans sa fonctionnalité a pour résultat d'entraîner une défectuosité importante dans le mécanisme de réparation de l'ADN de REB, de mener à l'apoptose ou d'augmenter le nombre de mutations à la suite, par exemple, d'une exposition à des agents alkylants ou des RI [de Murcia et al., 1997; Kupper et al., 1995; Menissier de Murcia et al., 2003]. Il existe

une interaction physique entre les protéines WRN et PARP1 [Adelfalk et al., 2003; Lebel et al., 2003; von Kobbe et al., 2003]. De plus, WRN et PARP1 coopèrent ensemble dans la prévention de la carcinogenèse *in vivo*. L'étude utilise les souris doubles mutantes pour les gènes, $WRN^{\Delta Hel/\Delta Hel}$ et $PARP1^{-/-}$, pour démontrer une augmentation de la fréquence d'apparition d'aberrations chromosomiques et une apparition précoce de la formation de tumeurs comparé à des souris mutées pour le gène $WRN^{\Delta Hel/\Delta Hel}$ ou $PARP1^{-/-}$ seulement [Lebel et al., 2003]. Des interactions fonctionnelles entre les deux protéines permettent d'affirmer que la protéine PARP1 servirait de régulateur pour les fonctions exonucléase et hélicase de WRN [von Kobbe et al., 2004a].

L'une des protéines qui peut intervenir dans l'un ou l'autre des sentiers du REB et qui interagit avec WRN est la polymérase à ADN bêta (DNA Pol_β) [Dianov et al., 1999; Sobol et al., 1996]. La fonction hélicase de WRN permet de stimuler le déplacement de DNA Pol_β sur le brin pendant la synthèse de l'ADN d'un intermédiaire du REB [Harrigan et al., 2003]. De plus, la fonction hélicase de WRN peut coopérer avec sa fonction exonucléase pour assister l'activité de la DNA Pol_β au niveau d'un mésappariement en 3' [Harrigan et al., 2006]. L'interaction protéique fonctionnelle et physique entre la flap endonucléase structure spécifique 1 (FEN1) et la protéine WRN implique cette dernière dans le traitement des fragments d'Okasaki pendant la synthèse tardive d'un brin d'ADN [Opresko et al., 2003]. En effet, des études réalisées sur la levure démontrent que FEN-1 détient un rôle important dans le traitement des fragments d'Okasaki [Merrill and Holm, 1998]. La protéine WRN stimule l'activité de clivage de l'ADN par FEN-1 au niveau de structures précises pendant le traitement des fragments d'Okasaki [Brosh et al., 2001b]. WRN stimule l'activité endonucléase de FEN1 qui retire le simple brin d'ADN saillant, généré par le déplacement du brin d'ADN pendant le LP-REB [Brosh et al., 2002].

1.4.4 WRN dans les sentiers modifiés par p53

Parmi les sentiers importants au niveau de la réparation du dommage à l'ADN dans lesquels WRN est impliquée, figurent les sentiers régulés par la protéine suppresseuse de tumeur p53. Une interaction fonctionnelle et physique entre les protéines p53 et WRN a été démontrée par co-immunoprécipitation [Blander et al., 1999; Spillare et al., 1999]. La

protéine p53 est un régulateur critique de l'arrêt du cycle cellulaire, de l'apoptose et de la sénescence (révisé dans [Campisi et al., 2001]). L'apoptose régulée par p53 est atténuée lors de l'absence de la protéine WRN, tandis que la surexpression de cette dernière augmente l'activation transcriptionnelle p53-dépendante du gène codant pour le p21 Waf1 [Blander et al., 1999; Spillare et al., 1999]. La protéine «cyclin-dependent kinase inhibitor 1» (p21 Waf1) est donc l'un des principaux médiateurs de l'arrêt du cycle cellulaire et sa transcription peut être activée en réponse à divers stress sous la dépendance de p53 qui agit alors comme facteur de transcription [Kim, 1997; Levine, 1997]. La surexpression de WRN a aussi pour effet de potentialiser l'apoptose toujours régulée par p53 [Blander et al., 1999]. D'un autre côté, la capacité de p53 de réguler l'expression de WRN est supportée par la découverte que la surexpression de la protéine p53 mène à la diminution de la transcription du gène WRN régulée par le facteur de transcription «Specificity Protein 1» (SP1) [Yamabe et al., 1998]. De plus, l'activité exonucléase de la protéine WRN est régulée négativement par la protéine p53 de type sauvage [Brosh et al., 2001a]. L'arrêt de la réplication de l'ADN en phase S induite par l'hydroxyurée cause la relocalisation de WRN au niveau de foyers nucléaires avec p53 [Brosh et al., 2001a] ce qui suggère que les deux protéines pourraient agir ensemble au niveau de la réponse cellulaire à l'arrêt de la fourche de réplication [Opresko et al., 2003]. Une activité synergique entre WRN et la protéine p53 a été observée chez des modèles de souris SW [Lebel et al., 2001; Lombard et al., 2000]. En effet, chez ce modèle de souris il y a une accélération de la formation de tumeurs et un changement dans le spectre de type de tumeurs comparé au modèle de souris p53 nulle seulement.

1.5 Hypothèses et objectifs de l'étude

La protéine WRN aiderait l'ouverture de l'ADN par l'intermédiaire de son domaine hélicase ou modifierait les extrémités de cassures dans l'ADN de concert avec des partenaires protéiques spécifiques non identifiés lors de la réparation ou la transcription de gènes dans les cellules. En effet, malgré le fait que quelques partenaires importants de la protéine WRN soient déjà identifiés et caractérisés, ces interactions n'expliquent pas complètement

le phénotype et les pathologies associées au vieillissement du syndrome, comme le diabète ou la présence de cataractes par exemple. Afin de trouver de nouvelles pistes d'explications et d'identifier de nouveaux partenaires protéiques de WRN, nous avons effectué une étude utilisant le LC-MS/MS à partir d'une immunoprécipitation de eYFP-WRN avec les protéines interagissant avec cette construction et des prédictions basées sur la bioinformatique. L'utilisation de la construction eYFP-WRN permet l'utilisation d'un anticorps dirigé contre le peptide fluorescent servant d'étiquette. Ce type d'anticorps nous permettra de simplifier la détection en augmentant la spécificité par rapport à l'utilisation d'un anticorps dirigé contre la protéine d'intérêt directement. Ainsi, nous espérons qu'aucune protéine pouvant être un partenaire potentiel ne sera négligée.

Parmi les nouveaux partenaires potentiels identifiés, la protéine Ribosomale S3 (RPS3) a été retenue pour confirmer l'interaction directe entre WRN et celle-ci. Les sentiers communs sur lesquels ces deux protéines semblent être impliquées rendent l'étude de cette interaction en particulier très intéressante.

Chapitre II

Résultats

Résumé de l'article

Le syndrome de Werner (SW) est caractérisé par l'apparition précoce de plusieurs pathologies normalement associées au vieillissement. La protéine défectueuse chez les patients SW (WRN) est une hélicase/exonucléase impliquée dans la réparation de l'ADN, la réplication, la maintenance des télomères et la transcription. Dans cet article, nous vous présentons les résultats d'une analyse protéomique à large spectre pour déterminer les partenaires protéiques de WRN. Nous avons introduit la protéine WRN couplée à une étiquette fluorescente jaune (eYFP-WRN) dans les cellules embryonnaires de reins humains 293 et détecté les protéines partenaires par une co-immunoprécipitation à partir des extraits cellulaires. Nous avons identifié, par spectrométrie de masse, 220 protéines nucléaires qui s'associent avec WRN. Ce nombre fût réduit à 40 lorsqu'une nucléase à large spectre fut ajoutée au lysat. Nous avons considéré que ces 40 protéines interagissent directement avec WRN. Quelques-uns des partenaires protéiques de WRN étaient déjà connus et confirmés par d'autres études, mais la plupart d'entre eux sont nouveaux. Parmi les 15 plus abondants, les nouveaux partenaires trouvés sont, entre autres, TMPO, HNRNPU, RPS3, RALY, RPS9, DDX21 et HNRNPM. C'est protéines sont des composantes importantes dans la compréhension des fonctions de WRN par rapport au vieillissement prématuré et méritent des investigations approfondies. Nous avons confirmé l'interaction entre la protéine WRN endogène et la protéine RPS3 endogène, une protéine ribosomale possédant une activité endonucléase impliquée dans la reconnaissance des dommages oxydatifs à l'ADN. Enfin, nos résultats suggèrent que l'utilisation de la nucléase pendant la lyse cellulaire restreint sévèrement les partenaires protéiques interagissant et, de ce fait, augmente la spécificité.

Proteome-wide Identification of WRN-Interacting Proteins in Untreated and Nuclease-Treated Samples

Sophie Lachapelle[†], Jean-Philippe Gagné[‡], Chantal Garand[†], Myriam Desbiens[†], Yan Coulombe[†], Wilhelm A. Bohrs, Michael J. Hendzell^{||}, Jean-Yves Masson[†], Guy G. Poirier^{‡,⊥}, and Michel Lebel^{*†}

[†] Centre de Recherche en Cancérologie de l'Université Laval, Hôpital Hôtel-Dieu de Québec, Québec City, Québec, G1R 2J6, Canada

[‡] Centre Hospitalier de l'Université Laval, Faculty of Medicine, Laval University, Québec, G1V 4G2, Canada

[§] Laboratory of Molecular Gerontology, National Institute on Aging, National Institutes of Health, 5600 Nathan Shock Drive, Baltimore, Maryland 21224, United States

^{||} Cross Cancer Institute and Department of Oncology, Faculty of Medicine, University of Alberta, Edmonton, Alberta, T6G 1Z2, Canada

[⊥] Proteomics Platform, Québec Genomic Center, Faculty of Medicine, Laval University, Québec, G1V 4G2, Canada

*To whom correspondence should be addressed

Centre de Recherche en Cancérologie de l'Université Laval Hôpital Hôtel-Dieu de Québec

9 McMahon Street
Quebec City, Quebec G1R 2J6
Canada.

Phone: 418-691-5281

Fax: 418-691-5439

E-mail: michel.lebel@crhdq.ulaval.ca

Keywords: LC-MS/MS; proteomics; Werner syndrome; ribosomal protein; nuclease treatments

Supplementary informations available at <http://pubs.acs.org/doi/suppl/10.1021/pr100990s>

Abstract

Werner syndrome (WS) is characterized by the premature onset of several age-associated pathologies. The protein defective in WS patients (WRN) is a helicase/exonuclease involved in DNA repair, replication, telomere maintenance, and transcription. Here, we present the results of a large-scale proteome analysis to determine protein partners of WRN. We expressed fluorescent tagged-WRN (eYFP-WRN) in human 293 embryonic kidney cells and detected interacting proteins by co-immunoprecipitation from cell extract. We identified by mass spectrometry 220 nuclear proteins that complexed with WRN. This number was reduced to 40 when broad-spectrum nucleases were added to the lysate. We consider these 40 proteins as directly interacting with WRN. Some of these proteins have previously been shown to interact with WRN, whereas most are new partners. Among the top 15 hits, we find the new interactors TMPO, HNRNPU, RPS3, RALY, RPS9 DDX21, and HNRNPM. These proteins are likely important components in understanding the function of WRN in preventing premature aging and deserve further investigation. We have confirmed endogenous WRN interaction with endogenous RPS3, a ribosomal protein with endonuclease activities involved in oxidative DNA damage recognition. Our results suggest that the use of nucleases during cell lysis severely restricts interacting protein partners and thus enhances specificity.

2.1 Introduction

Werner Syndrome (WS) is an autosomal recessive disorder that displays many of the clinical symptoms of normal aging at an early age. From their second decade of life onward, WS patients develop pathologies that prematurely resemble many traits of normal aging such as osteoporosis, ocular cataracts, graying and loss of hair, diabetes mellitus, arteriosclerosis, and cancer [Epstein et al., 1966; Ozgenc and Loeb, 2005; Salk, 1982; Yu et al., 1996]. Death generally occurs in the fifth decade of life from heart demise or cancer. Accumulating evidence indicates that WRN protein is a suppressor of illegitimate recombination. Indeed, WS cells are characterized by the presence of deletions and variegated chromosomal translocations [Scappaticci et al., 1990; Schonberg et al., 1984]. Processes such as DNA replication or transcription generate regions of single-stranded DNA, which may inadvertently provide a substrate for the initiation of recombination. Various mechanisms have evolved to ensure that recombination does not occur promiscuously during these processes and the WRN protein may be part of one such mechanism. Thus, one potential role for WRN would be to actually monitor recombinational repair of double-strand breaks at sites of DNA replication like it has been demonstrated for the RecQ DNA helicase orthologue in *Escherichia coli* [Hanada et al., 1997]. During the process of recombination, nonhomologous regions of DNA could inadvertently be used as templates for repair. WRN protein will not inhibit the initiation of recombination but will dissociate abnormal recombination intermediates [Constantinou et al., 2000; Prince et al., 2001; Saintigny et al., 2002]. Accordingly, purified WRN protein has an affinity for DNA fork structures such as those observed during DNA recombination [Orren et al., 1999]. Furthermore, WRN can migrate Holliday junctions (a recombination intermediate) [Constantinou et al., 2000]. Thus, a mutation in WRN may lead to an increased frequency of illegitimate recombination during the repair of breaks at transcriptional sites or DNA replication forks, creating small deletions or variegated chromosomal translocations. Consequently, it is likely that repetitive sequences will show multiple recombinational errors affecting the length of such structures during DNA replication in WS cells. Incidentally, there is evidence indicating accelerated shortening and lengthening of telomeres in serially passaged human WS cultures [Schulz et al., 1996; Tahara et al., 1997] and in murine *Wrn* helicase mutant cell lines [Lavoie et al., 2003; Lebel et al., 2003]. This telomeric instability in WS cells is believed to be due to illegitimate recombination between telomeres of different chromosomes [Laud et al., 2005]. It is known

that an increase in chromosome instability may be associated with loss of telomeric repeats [Greider, 1996]. In addition to homologous recombination, WRN is involved with the KU complex and DNA-PK in nonhomologous end joining reactions [Cooper et al., 2000; Li and Comai, 2000]. Finally, it also interacts with RPA and PARP-1 [Brosh et al., 1999; von Kobbe et al., 2003]. Thus, WRN is likely to be involved in several DNA repair pathways. In the absence of a functional WRN protein, accumulation of deletions and translocations could potentially inactivate tumor suppressor genes or activate oncogenes, accelerating tumor formation and/or aggressiveness. Such mutations could also potentially inactivate genes involved in normal cellular metabolism inducing senescence and accelerated aging. In addition to defects in DNA replication and repair, defects in transcription have also been observed in WS cell lines implicating WRN in some aspects of transcription as well. Analysis of the expression profile of primary human fibroblast cell lines derived from young donors, old donors, and WS patients have indicated that transcription alterations in WS are strikingly similar to those in normal cells established from old individuals [Kyng et al., 2003]. Furthermore, we recently determined that microarray analyses on short-term knock down of WRN protein was sufficient to induce an expression profile resembling that of fibroblasts derived from old individuals [Turaga et al., 2009].

Despite advances in understanding how the WRN exonuclease/helicase enzyme contributes to DNA replication and repair, precisely how the absence of functional WRN protein leads to the numerous pathologies characteristic of Werner syndrome, some of which might be independent of genome maintenance defects (e.g., dyslipidemia, diabetes and cataracts), is still unknown. In this study, we conducted the first large-scale proteomics investigation to identify new candidates for WRN binding that would give us clues on biological processes altered by WRN in cells. As WRN is a nucleic acid binding protein, two different cell extract approaches were used, one using Benzonase[®] and RNase A during lysis and one without nuclease pretreatments before immunoprecipitation of a tagged WRN construct in HEK 293 cells. Mass spectrometry analysis of the co-immunoprecipitate in the absence of nucleases revealed 220 nuclear proteins potentially interacting with WRN peptide. In nucleic acids depleted extracts, however, only 40 nuclear proteins were identified as direct interactants of the WRN protein in HEK 293 cells.

2.2 Material and methods

2.2.1 Cell Line and Expression Vectors

Human 293 embryonic kidney cells were maintained in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) supplemented with 10% fetal bovine serum, penicillin (250 IU/mL), and streptomycin (250 μ L/mL) at 37 °C in atmosphere of 5% CO₂. The eYFP control vector was purchased from Clontech (Mountain View, CA). The eYFP-WRN construct is described elsewhere [Baynton et al., 2003].

2.2.2 eYFP-WRN Immunoprecipitation

Human 293 embryonic kidney cells were seeded onto nine 150 mm cell-culture dishes and grown up to 80-90% confluency. Transfections were performed with the Effectene transfection kit from Qiagen, Inc. (Mississauga, ON). All further steps were performed 24 h after the transfections on ice or at 4 °C. Two PBS washes were carried out prior to the extraction (cell scraping) with 2 mL/plates of lysis buffer [40 mM HEPES pH 7.5, 120 mM NaCl, 0.3% CHAPS, 1 mM EDTA, Complete protease inhibitor cocktail (Roche Applied Science, Indianapolis, IN)]. When indicated, Benzonase (25 U/mL) and RNase A (100 μ g/mL) (EMD, Gibbstown, NJ) were added in the buffer. Cells were kept on ice for 15 min and gently lysed for another 15 min on a rotating device. Cell extracts were centrifuged for 5 min at 3000g to remove cellular debris and insoluble material. Immunoprecipitation experiments were performed using Dynabeads magnetic beads covalently coupled with Protein G (Invitrogen, Burlington, ON). The Dynabeads were washed two times with 1 mL of 0.1 M sodium acetate buffer, pH 5.0, coated with 10-15 μ g of mouse monoclonal anti-GFP antibody, which also recognizes eYFP protein (Roche Applied Science, Indianapolis, IN). The antibody-coupled Dynabeads were incubated for 1 h at room temperature with 1 mL of PBS containing 1% (w/v) BSA (Sigma-Aldrich, Oakville, ON) to block nonspecific antibody binding sites. The beads were finally washed three times with 1 mL of lysis buffer and added to the protein extract for 4 h incubation with gentle agitation in a cold room. (Protein extracts had been precleared with empty Dynabeads for 45 min in a cold room before adding the anti-GFP coupled beads.) Samples were then washed three times with 2 vol of lysis buffer for 5 min. Protein complexes were eluted using 150 μ L of 2 \times Laemmli sample buffer containing 5% β -mercaptoethanol and boiled for 5 min in a water bath. Proteins were resolved using 4-12% Criterion XT Bis-Tris gradient gel (Bio-Rad, Mississauga, Canada) and stained with Sypro Ruby (Bio-Rad, Mississauga, ON) according

to the manufacturer's instructions. Images were acquired using the Geliance CCD-based imaging system (Perkin-Elmer, Shelton, CT).

2.2.3 Exonuclease and Helicase Activities of Immunoprecipitated eYFP-WRN

One 150-mm Petri dish of HEK 293 cells (1.8×10^8 cells) was transfected with 2 μ g of the eYFP or the eYFP-WRN plasmids with the Effectene transfection kit from Qiagen, Inc. The next day, eYFP and eYFP-WRN transfected cells were lysed in 1 mL of a stringent buffer [50 mM Tris-HCl pH 8.0, 150 mM NaCl, 1.0% NP-40, 0.1% SDS, 0.5% Sodium deoxycholate, Complete protease inhibitor cocktail (Roche Applied Science, Indianapolis, IN)]. eYFP and eYFP-WRN were immunoprecipitated with 2 μ g of an antibody against YFP and magnetic beads as described above. Immunoprecipitation was carried out for 2 h in a cold room. Beads containing the immune complexes were washed once with 1 mL of a buffer containing 20 mM Tris-HCl pH 8.0, 0.5 M NaCl, 1 mM EDTA, 0.5 mM DTT, 0.5% NP-40, 25% Glycerol, 0.2 mM PMSF. Beads were then washed twice with 2 mL of a buffer containing 20 mM Tris-HCl pH 8.0, 150 mM NaCl, 25% Glycerol, 0.5% NP-40, 0.05% Sodium deoxycholate, 0.005% SDS. Finally, beads were resuspended in 15 μ L of buffer (25 mM Tris-HCl pH 8.0, 0.5 mM EDTA, 1 mM DTT, 0.05% NP-40, 25% glycerol). Resuspended beads containing the immune complexes ($\sim 0.1 \mu$ g/ μ L of antibody) were diluted as indicated in the figures in assay reaction buffer (40 mM Tris-HCl pH 7.4, 4 mM MgCl₂, 0.1 mg/mL BSA, 5 mM DTT, and 100 nM of splayed arms labeled on one DNA strand [Buisson et al.]). The reaction was incubated for 20 min at 37 °C, and stopped with one-fifth volume of Stop buffer (40% glycerol, 50 mM EDTA, 2% SDS, 3% xylene cyanol and 3% bromophenol blue). Reaction samples were loaded on a 6% PAGE/TBE 1 \times for autoradiography.

2.2.4 LC_MS/MS Analysis

SDS-PAGE protein lanes corresponding to anti-eYFP immunoprecipitated extracts were cut into 33 gel slices per lane using a disposable lane picker (The Gel Company, CA). Gel slices were deposited into 96-well plates. In-gel protein digest was performed on a MassPrep liquid handling station (Waters, Mississauga, Canada) according to the manufacturer's specifications and using sequencing-grade modified trypsin (Promega, Madison, WI). Peptide extracts were dried out using a SpeedVac.

Peptide extracts were separated by online reversed-phase (RP) nanoscale capillary LC (nanoLC) and analyzed by electrospray MS (ES MS/MS). The experiments were performed on a Thermo Surveyor MS pump connected to a LTQ linear ion trap mass spectrometer (Thermo Electron, San Jose, CA) equipped with a nanoelectrospray ion source (Thermo Electron, San Jose, CA). Peptide separation took place within a PicoFrit column BioBasic C18, 10 cm \times 0.075 mm internal diameter (New Objective, Woburn, MA) with a linear gradient from 2% to 50% solvent B (acetonitrile, 0.1% formic acid) in 30 min, at 200 nL/min. Mass spectra were acquired using data-dependent acquisition mode (Xcalibur software, version 2.0). Each full-scan mass spectrum (400_2000 m/z) was followed by collision-induced dissociation of the seven most intense ions. The dynamic exclusion function was enabled (30 s exclusion), and the relative collisional fragmentation energy was set to 35%.

2.2.5 Interpretation of Tandem MS Spectra

All MS/MS samples were analyzed using Mascot (Matrix Science, London, U.K.; version 2.3). Mascot was set up to search against human Uniref_100 protein database (*Homo sapiens*: Taxon 9606, 100 683 entries) assuming a digestion with trypsin. Fragment and parent ion mass tolerance were, respectively, of 0.5 and 2.0 Da. Iodoacetamide derivative of cysteine was specified as a fixed modification and oxidation of methionine was specified as variable modification. Two missed cleavages were allowed. Peak list was generated by Mascot Daemon with Extract_MSN.exe.

2.2.6 Criteria for Protein Identification

Scaffold (version 03_00_02; Proteome Software, Inc., Portland, OR) was used to validate MS/MS-based peptide and protein identifications. Peptide identifications were accepted if they could be established at >95.0% probability as specified by the Peptide Prophet algorithm [Keller et al., 2002]. Protein identifications were accepted if they could be established at >95.0% probability and contained at least two identified peptides. Protein probabilities were assigned by the Protein Prophet algorithm [Nesvizhskii et al., 2003]. Proteins that contained similar peptides and could not be differentiated based on MS/MS analysis alone were grouped to satisfy the principles of parsimony. Using these

stringent identification parameters, 15013 spectra were annotated (646 protein identifications with a false discovery rate of 0.1% calculated from Scaffold's statistical analysis). Scaffold 3 analysis files (IP-WRN.sf3 and IP-WRN+Benzonase.sf3) are provided as Supporting Information (see <http://pubs.acs.org/doi/suppl/10.1021/pr100990s> site on internet). These files can be accessed with the free viewer available in Proteome Software, Inc. Web site (<http://www.proteomesoftware.com>). These files contain all the spectral information, including the accession number for each protein sequence, Mascot scores, protein sequence coverage, statistical probability modeling, and spectral counting.

2.2.7 Immunoblotting

Protein extracts eluted from Dynabeads were separated on SDS-PAGE and then transferred onto 0.2 μ m nitrocellulose membrane (Bio-Rad). After incubating 1 h with blocking solution (PBS-T containing 5% nonfat milk), the membrane was probed overnight at 4 °C with either a mouse monoclonal antibody against KI-67 antigen (clone MIB-1; Dako, Denmark), a mouse monoclonal antibody against nucleophosmin (B-23) (clone FC82291; Sigma, St. Louis, MO), a mouse monoclonal antibody against MSH2 (clone FE11; Oncogene Research Products, Boston, MA), a mouse monoclonal antibody against Lamin B1 (clone P3X63-Ag.653; US Biologicals, Swampscott, MA), a mouse monoclonal antibody against HNRPK (D-6; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), a rabbit polyclonal antibody against HNRPC1/C2 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), a rabbit polyclonal antibody against MSH3 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), a rabbit polyclonal antibody against XRCC1 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), a rabbit polyclonal antibody against POLR2B (Novus Biologicals, Littleton, CO), or a rabbit polyclonal antibody against WRN (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA). The antibody against GFP (or eYFP) was purchased from BD Biosciences (Palo Alto, CA). After washing with PBS-T, species-specific horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody was added for 2 h at room temperature. Signals were detected with Western Lightning Chemiluminescence reagent plus kit (GE Healthcare Limited, Piscataway, NJ). Immunoprecipitation of the endogenous WRN was performed with a goat polyclonal antibody from Santa Cruz Biotechnology (antibody C-19; Santa Cruz, CA).

2.2.8 Bioinformatic Tool for Protein Network Analysis

The PANTHER (Protein ANalysis THrough Evolutionary Relationships) Classification System is a unique resource that classifies genes by their functions, using published scientific experimental evidence and evolutionary relationships to predict function even in the absence of direct experimental evidence. Proteins are classified by expert biologists into families and subfamilies of shared function, which are then categorized by molecular function and biological process ontology terms (www.pantherdb.org). Enrichments for specific biological functions were considered significant with a Benjamini value smaller than 0.05. The Benjamini value corresponds to an adjusted *p*-value using the Benjamini_Hochberg method to correct for multiple hypotheses tested during gene enrichment analyses.

2.2.9 Evaluation of Protein Domain and Family Distribution

The Pfam (<http://pfam.sanger.ac.uk/>) domains were obtained by parsing the ‘swisspfam’ (version Pfam 22.0, July 2007, 9318 families) database using in-house Ruby scripts (version 1.8.6), which output Microsoft Excel-compatible spreadsheets suitable for further analysis. Data sets were generated from all the proteins identified by LC_MS/MS from the eYFP-WRN immunoprecipitation experiments (without nucleases).

2.2.10 Live Cell Imaging and Laser Microirradiation

Live cell imaging combined with laser microirradiation was carried out as described previously [Haince et al., 2008]. Briefly, eYFP-WRN was expressed in HeLa cells by overnight transfection with Effectene reagent (Qiagen). Cells were placed in medium containing 1 μ g/mL Hoechst 33258 for 30 min. The medium was then removed and replaced with fresh one. A 37 °C preheated stage was used during the acquisition period. Fluorescence in a living cell was monitored using a Zeiss LSM510 NLO laser-scanning confocal microscope. DNA damage was generated in a defined area of the nucleus by microirradiation with a 750-nm femtosecond pulsed titanium-sapphire laser. Time-lapse images were acquired and fluorescence intensities within the microirradiated nuclear region were quantitated. Background and photobleaching corrections were applied to each data sets as described.

2.3 Results

2.3.1 Identification of WRN-Interacting Proteins by Mass Spectrometry

To identify proteins that interact with the human WRN gene product, we transfected human 293 embryonic kidney cells with an eYFP-WRN expression construct. We used a tagged version of the WRN protein because one potential limitation in using anti-WRN antibodies is the interference of the antibodies with WRN protein complex formation in cells. Furthermore, the WRN epitopes recognized by the antibodies maybe embedded in protein complexes and unreachable, impeding the identification of important interactors in our analyses. The advantage of using the eYFP-WRN chimera is the presence of good commercial antibodies against eYFP for large-scale immunoprecipitation and the behavior of the eYFP-WRN protein, which is similar to the endogenous WRN protein in cell culture [Guay et al., 2006; Opresko et al., 2004]. Indeed, eYFP-WRN proteins were mainly localized to nucleoli in HEK 293 cells (Figure 1A) and translocated with very fast kinetics to regions of DNA breaks generated by laser-induced DNA damage microirradiation (Figure 1B). In addition, we analyzed the enzymatic activities of immunoprecipitated eYFP-WRN on a radioactive forked DNA structure (Figure 1C). As a control, we transfected 293 embryonic kidney cells with the eYFP expression vector. The immunoprecipitate was stringently washed with buffers containing high salt concentration, sodium deoxycholate and SDS. As indicated in Figure 1C,D, there was no helicase or exonuclease activities associated with the eYFP immunoprecipitate. In contrast, the eYFP-WRN immunoprecipitate showed both activities on the forked DNA substrate indicating that the catalytic sites of the eYFP-WRN construct are functional. Such controls ensured that the eYFP-tagged WRN protein co-localized to the same compartment as the endogenous protein and that the fusion protein retained the biochemical functions of the endogenous WRN protein.

Lachapelle et al. Figure 1

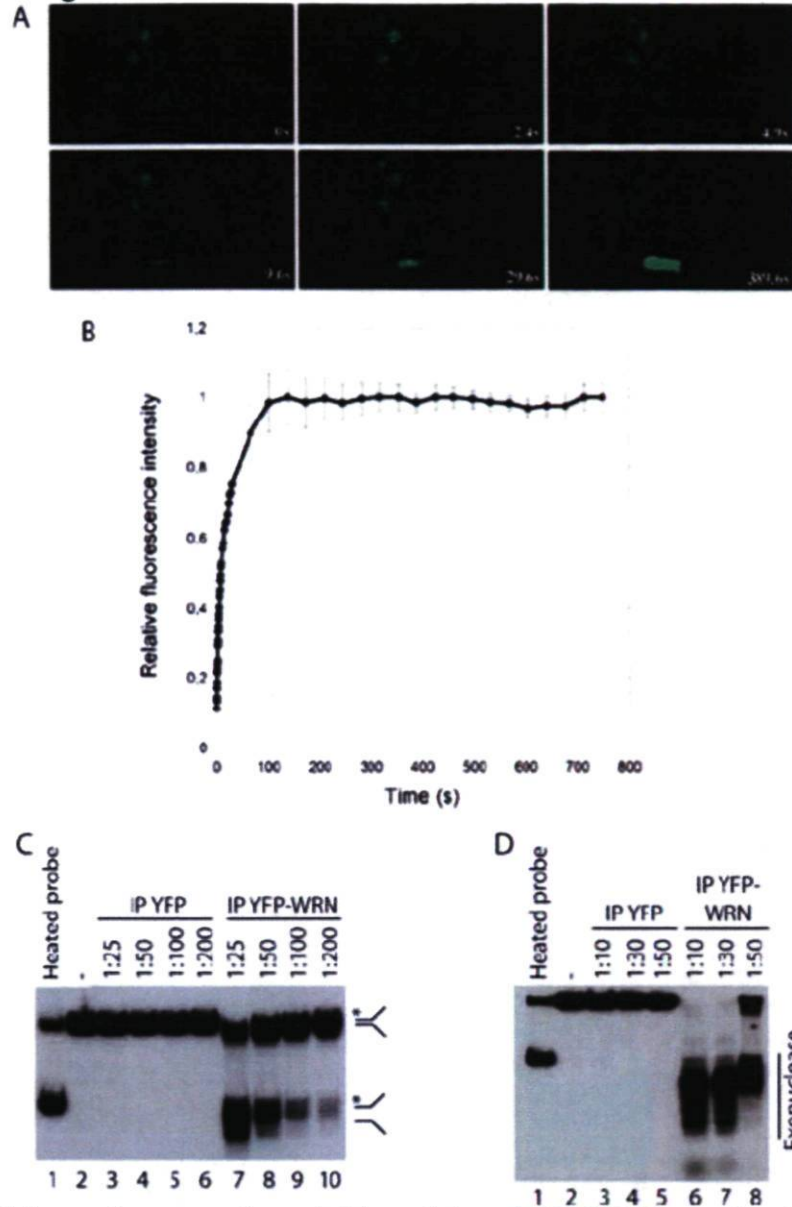


Figure 1. Cellular and enzymatic activities of the eYFP-WRN protein. (A) Time course localization of the eYFP-WRN protein in a representative HEK 293 cell by live imaging after microlaser beam application. The path of the laser is indicated by a rectangle box in the image at 0 s. Magnification is 40 \times . (B) Recruitment kinetics of eYFP-WRN shown by the fluorescence intensity to sites of DNA damage after microlaser beam application. (C) Helicase activity of the eYFP WRN protein. Immunoprecipitated eYFP (lanes 3-6) or YFP-WRN (lanes 7-10) were diluted in reaction buffer 1/25, 1/50, 1/100, and 1/200, as indicated. The position of the displaced strand is indicated on the right. Autoradiogram represents a 6h exposition. Lane 1, heated splayed arm substrate; lane 2, no protein. (D) Exonuclease activity of the eYFP-WRN protein. Immunoprecipitated eYFP (lanes 3-5) or YFP-WRN (lanes 6-8) were diluted in reaction buffer 1/10, 1/30, and 1/50 to better see the exonuclease activity. Nuclease fragments are indicated on the right. Lane 1, heated splayed arm substrate; lane 2, no protein. Autoradiogram represents 18 h of exposition.

For the mass spectrometry analyses, immunoprecipitation assays were carried out under rather mild detergent and ionic strength that allowed efficient isolation of intact protein complexes (see Materials and Methods). The immunoprecipitated proteins were resolved by SDS-PAGE and stained with Sypro Ruby. A first eYFP-WRN immunoprecipitation experiment was performed in a context where nucleases were omitted in the lysis buffer to get potentially the whole WRN interactome. In addition, the entire protein load resolved by SDS-PAGE was extracted for a complete coverage of the co-immunoprecipitated proteins rather than limited to high-abundance protein bands. Protein tracks were thus cut into several gel slices for trypsin digestion followed by liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC_MS/MS). MS/MS spectra were assigned to peptides using Mascot search engine and further validated using Scaffold's program statistical analysis. Assignments were grouped according to corresponding proteins and the probability of correct protein assignment was computed. Scaffold reports were generated to include all spectral information. This information is displayed in the supplementary Scaffold files (IP-WRN.sf3 and IP-WRN+Benzonase.sf3) and can be modulated according to appropriate filters criteria. Readers can refer to these files using the free Scaffold viewer easily accessible on the Proteome Software Web site. Scaffold uses proven statistical algorithms (PeptideProphet and ProteinProphet) to calculate the probability that proteins are actually in the biological samples. The data from the Mascot search engine is mapped on a histogram demarcated by discriminating scores. In addition, Bayesian statistics were used to determine the probability that a match is correct at each discriminating score. Detailed results help detect false positives by allowing the reader to focus on a protein and examine the peptide and spectra evidence supporting the identification. For this study, we applied stringent probability thresholds (>95% confidence for peptide and proteins annotations supported by at least two unique peptides). These criteria result in an estimated protein false discovery rate (Prot FDR) of only 0.1% as calculated by Scaffold. Supplementary Table S1 gives a list of all the proteins identified by LC_MS/MS. A protein interacting with WRN was considered positive if at least two unique peptides for the same protein were identified. Proteins identified in control HEK 293 immunoprecipitates (expressing eYFP alone) were considered artifacts and removed from the final list of potential eYFP-WRN-interacting proteins. The Supplementary Table S2a gives a list of total proteins identified without eYFP interacting proteins. The Supplementary Table S2b gives a list of all the identified proteins in the eYFP-WRN immunoprecipitate with at least two identified unique

peptides. Since WRN is exclusively a nuclear protein, we finally restricted the remaining of our study to a list containing exclusively nuclear proteins or proteins known to shuttle to the nucleus. Supplementary Table S3 gives a list of 220 nuclear proteins co-immunoprecipitating with the eYFP-WRN construct.

Our nuclear interactome data set was compared to six public protein interaction databases that store both potential and confirmed WRN-interacting proteins. Queried databases included the Biomolecular Interaction Network Database (BIND), the Database of Interacting Proteins (DIP), the Human Protein Reference Database (HPRD), the Online Predicted Human Interaction Database (OPHID), the Human Protein-Protein Interaction Prediction (PIPs), and the Molecular Interactions Database (MINT). Out of the 49 proteins predicted or confirmed to interact with WRN (Table 1), 21 of them are present in our list from Supplementary Table S3. Comparison of the proteomics data set with interactions reported in the literature revealed a high success rate in detection of known complexes (see [Discussion](#)). However, some reported WRN-interacting proteins are yet to be validated using proteomics approaches. Clearly, the composition of the WRN interactome is highly subject to modulation in the context of DNA damage. Importantly, transfected HEK 293 cells used in this study were not stressed by genotoxic agents known to cause decompartmentalization of WRN from the nucleoli to the nucleoplasm and its accumulation into DNA damage foci. It is also likely that transient interaction of WRN might occur with components of the DNA damage repair machinery and might have been missed in this study. Finally, it is unknown whether WRN interacts with the same partners in different cell types an issue that warrants further investigation.

Table 1. List of Proteins Previously Identified or Predicted in the Literature to Interact with WRN

protein name	description	mass spectrometry
ABL	c-Abl tyrosine kinase	
ATR	Serine-protein kinase ATM-related	Identified in our analysis
ATM	Serine-protein kinase ATM	
BLM	Bloom syndrome protein	Identified in our analysis
BRCA1	Breast Cancer susceptibility Region 1	
CDKN2A	Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A (p14ARF)	
DDX17	Probable ATP-dependent RNA helicase DDX17	Identified in our analysis
DDX3X	ATP-dependent RNA helicase DDX3X	Identified in our analysis
DDX5	Probable ATP-dependent RNA helicase DDX5	Identified in our analysis
PRKDC	DNA dependent protein kinase catalytic subunit	Identified in our analysis
DPOE2	DNA polymerase epsilon subunit 2	
EXO1	Exonuclease 1	
FEN1	Flap structure-specific endonuclease 1	
H2AX	Histone H2AX	
KU complex	KU70 and KU86 proteins	Identified in our analysis
LIG1	Ligase I, DNA, ATP-dependent	
MCM2	Minichromosome maintenance complex component 2	
MRN complex	MRE11, NBS1, and RAD50 proteins	Identified in our analysis
MSH2	DNA mismatch repair protein MSH2	Identified in our analysis
MSH3	DNA mismatch repair protein MSH3	Identified in our analysis
MSH6	DNA mismatch repair protein MSH6	
NEIL1	DNA glycosylase (nei endonuclease VIII-like 1)	
PARP-1	Poly (ADP-ribose) polymerase-1	Identified in our analysis
PARP-2	Poly (ADP-ribose) polymerase-2	
PCNA	Proliferating cell nuclear antigen	Identified in our analysis
POLB	DNA polymerase beta subunit	
POLD1	DNA polymerase delta 1 subunit	
POLR1C	DNA-directed RNA polymerases I subunit RPAC1	
POT1	Protection of telomere homologue 1	
PRKDC	DNA dependent protein kinase catalytic subunit	Identified in our analysis
RAD51	DNA repair protein RAD51	
RAD52	DNA repair protein RAD52	
RAD54	DNA repair protein RAD54	
RECQL	ATP-dependent DNA helicase Q1	
RFC1	Replication factor C (activator 1) 1, 145 kDa	Identified in our analysis
RPA1	Replication protein A 70 kDa DNA-binding subunit	Identified in our analysis
RPA2	Replication protein A2, 32 kDa	Identified in our analysis
SUMO1	SMT3 suppressor of mif two 3 homologue 1 (<i>S. cerevisiae</i>)	
TP53	Tumour Protein p53	Identified in our analysis
TRF1	Telomeric repeat binding factor 1	
TRF2	Telomeric repeat binding factor 2	
UBC9	SUMO-conjugating enzyme	
VCP	Transitional endoplasmic reticulum ATPase	
WRNIP1	Werner helicase-interacting protein 1 (WHIP)	
YBX1	Y box 1 transcription factor	Identified in our analysis

A bigger version of this table can be found at:
<http://pubs.acs.org/doi/suppl/10.1021/pr100990s>

2.3.2 Identification of WRN-Interacting Proteins in DNA and RNA Depleted Cell Extracts by Mass Spectrometry Analysis

A Pfam classification of the 220 nuclear proteins identified in eYFP-WRN immunoprecipitation extracts indicated that the largest families of proteins associated with WRN were helicases and proteins with RNA binding motifs (Supplementary Table S4). One potential caveat with this type of analysis, however, is the co-immunoprecipitation of proteins that form complexes with WRN via nucleic acid molecules without any direct protein-protein interaction. To exclude this possibility, additional immunoprecipitation experiments were performed in cells extracts depleted of nucleic acids. All DNA and RNA molecules were extensively digested with Benzonase, a highly active nuclease degrading all forms of DNA and RNA even at 4 °C. Extracts were also supplemented with RNase A. As before, eYFP immunoprecipitates were used to assess unspecific binding. The immunoprecipitation and mass spectrometry analysis were duplicated in two independent experiments. Figure 2A shows the proteins in the anti-eYFP immunoprecipitates resolved by SDS-PAGE and stained with Sypro Ruby. Staining of the gels indicates that the immunoprecipitations (performed on two different weeks) were technically highly reproducible (compare the left and right panels in Figure 2A). On average, the ratio of eYFP-WRN protein to endogenous WRN in transfected cells was approximately 5:1 based on Western blot analyses with an antibody against WRN protein (Figure 2B). Finally, we examined the efficiency of the nucleases in the buffer during the extraction and immunoprecipitation steps. Figure 2C indicates that nucleic acids were totally degraded in the presence of both Benzonase and RNases A.

Lachapelle and al. Figure 2

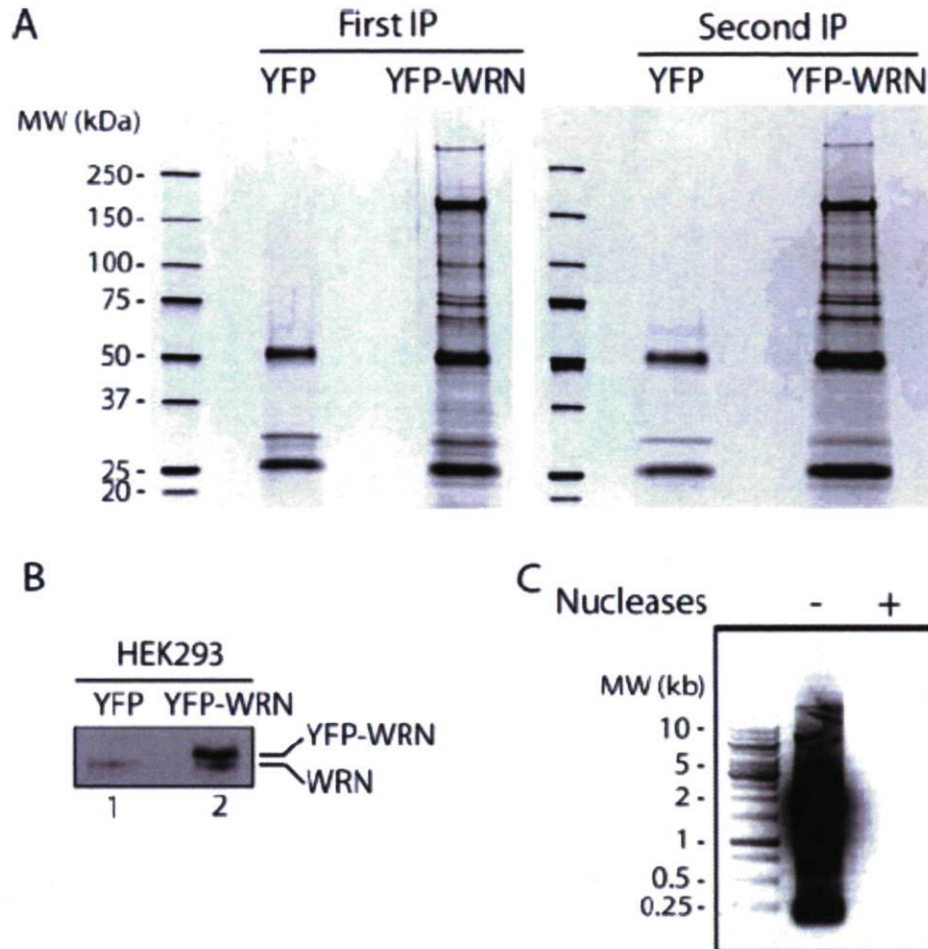


Figure 2. Co-immunoprecipitation of proteins from cells transfected with eYFP or eYFP-WRN constructs. (A) SYPRO Ruby-staining pattern of the co-immunoprecipitated proteins from transfected cells with the anti-YFP antibody. The immunoprecipitation was performed a second time (panel on the right) to show the reproducibility of the experiment. All immunoprecipitations were performed 24 h after the transfection reactions. Molecular-mass sizes are indicated in kilodaltons (kDa). (B) Levels of eYFP-WRN in transfected cells. HEK 293 cells were transfected with eYFP or eYFP WRN constructs. Twenty-four hours later, whole cell lysates were analyzed on 6% SDS-PAGE followed by Western blotting with an antibody against WRN protein. The positions of the EYFP-WRN and of the endogenous WRN proteins are indicated on the right. (C) Agarose gel showing the presence of nucleic acids without or with Benzonase and RNase A in the lysis buffer prior to the immunoprecipitation step. An aliquot (representing one 150-mm Petri dish of HEK 293 cells) was treated with phenol-chloroform and the nucleic acids were precipitated in ethanol. The whole precipitate were analyzed on a 1% agarose gel.

Protein tracks were cut into gel slices for trypsin digestion followed by liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC_MS/MS) as described in the preceding section. A protein interacting with the WRN enzyme was considered positive if at least two unique peptides for that same protein were identified. Proteins identified in control HEK 293 immunoprecipitates (expressing eYFP alone) were considered artifacts and removed from the final list of potential eYFP-WRN-interacting proteins. Supplementary Table 2c gives the complete lists of proteins co-immunoprecipitated with the eYFP-WRN in the presence of nucleases. From these, we parsed a list of nuclear proteins as described in the preceding section. Table 2 lists 40 nuclear proteins co-immunoprecipitating with the eYFP-WRN construct from the two consolidated data sets. Supplementary Table S5 gives more details on the origin of the proteins identified by mass spectrometry for each analysis. The most abundant co-immunoprecipitated proteins (identified with more than 10 unique peptides) were very similar whether cell extracts were treated with or without nucleases (Supplementary Table S5). Proteins such as DNA-PK, KU70, KU80, DHX9, RFA1, DNA ligase 3 or PARP-1 were among the proteins identified with the highest peptide coverage in both intact and nucleic acids depleted extracts. Since these interactions are not strictly tethered by DNA, it is likely that these proteins interact with WRN to form a stable complex which carry out the basic genome maintenance activities reported for WRN. Most interesting were also the identification of proteins such as the lamina-associated polypeptide 2-alpha (LAP2A) or the 40S ribosomal protein S3 (RPS3) in the same high abundance range as the proteins aforementioned, suggesting that these proteins might also be involved in strong binding to WRN. Finally, nuclease treatment could have also facilitated the release of some proteins tightly bound to DNA/RNA, allowing new unidentified transient interactions with WRN. Examples of such proteins include Histone 1 (H1e), THOC1, PELP1, BAT1, DDX1, and Histone H2A type 1-B/E proteins (see Supplementary Table S5 for a more detailed description of these proteins).

Table 2. List of WRN-Interacting Proteins Identified by Mass Spectrometry Using Benzoylase and RNase A in the Lysis Buffer

gene name	number of unique peptides		description
	First IP	Second IP	
WRN	70	77	Werner syndrome gene product
PRKDC	62	53	DNA-dependent protein kinase catalytic subunit
TMPO	29	29	Thymopoietin (lamina-associated polypeptide 2)
XRCC5	21	17	KU86 ATP-dependent DNA helicase 2 subunit 2
HNRNPU	16	28	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U
XRCC6	15	18	KU70 ATP-dependent DNA helicase 2 subunit 1
DHX9	13	13	DHX9 ATP-dependent RNA helicase A (DNA helicase II)
RPS3	9	14	40S ribosomal protein S3
RALY	9	7	Autoantigenic hnRNP-associated with lethal yellow
RPA1	7	11	Replication protein A 70 kDa DNA-binding subunit
RPS9	7	11	40S ribosomal protein S9
LIG3	7	6	DNA ligase 3
DDX21	6	3	Nuclear RNA helicase 2
HNRNPM	6	5	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein M
PARP-1	5	7	Poly [ADP-ribose] polymerase 1
RFC4	5	2	Replication factor C subunit 4
RPS3A	5	4	40S ribosomal protein S3A (v-fos effector protein 1)
VRK3	4	7	Vaccinia related kinase 3
HIST1H1E	4	7	Histone 1, H1e
HIST1H4A	4	6	Histone H4
DDX3X	4	5	DDX3X ATP-dependent RNA helicase
THOC1	4	2	THO complex 1 (nuclear matrix protein p84)
RPL5	4	3	60S ribosomal protein L5
TRIM28	3	4	Tripartite motif-containing 28
PELP1	3	4	Proline, glutamate and leucine rich protein 1
RBMX	3	3	HnRNP G, N-terminally processed
BAT1	3	2	HLA-B associated transcript 1
TOP1	3	2	DNA topoisomerase 1
RPA2	3	2	Replication protein A 32 kDa subunit
CCT8	3	2	T-complex protein 1 subunit theta
HNRNPUL2	2	4	HnRNP U-like protein 2
TFAM	2	3	Transcription factor A, mitochondrial
HIST1H2BK	2	3	Histone H2B type 1-K
RPL11	2	2	60S ribosomal protein L11
SUPT16	2	2	Facilitates chromatin remodeling subunit SPT16
DDX1	2	2	DDX1 ATP-dependent RNA helicase
HSPA5	2	2	Heat shock 70 kDa protein 5 (glucose-regulated)
SSRP1	2	2	Structure specific recognition protein 1
HERC2	2	2	Hect domain-containing protein 2 (E3 ubiquitin ligase)
SFRS1	2	2	Splicing factor, arginine/serine-rich 1
HIST1H2AB	2	2	Histone H2A type 1-B/E

A bigger version of this table can be found at:

<http://pubs.acs.org/doi/suppl/10.1021/pr100990s>

Supplementary Table S5 (bottom part of the Table) also indicates that 34 additional proteins were identified with high statistical confidence but these identifications rely on at least two unique peptides in one of the immunoprecipitation experiments (Ex: NPM1, RAD50). These proteins may represent the limit of detection for our mass spectrometry analysis.

2.3.3 Validation of the Proteomic Analyses by Western Analysis of Specific WRN Interactants in Untreated and Nuclease-Treated Immunoprecipitations

To confirm several new WRN-interacting proteins, we transfected HEK 293 cells with the eYFP and the eYFP-WRN expression vectors for co-immunoprecipitation experiments with an anti-eYFP antibody. The immunoprecipitates (without nuclease treatments) were analyzed by Western blotting. Western analyses were performed with antibodies against POLR2A, POLR2B, HNRPK, MSH2, XRCC1, Lamin B1, and nucleophosmin (B-23 or NPM1). As indicated in Figure 3, all the antibodies tested confirmed their co-immunoprecipitation with the eYFP-WRN construct but not with the eYFP control. When nucleases were used in the lysis buffer during the course of the immunoprecipitation, however, we could only detect significant amount of nucleophosmin in the eYFP-WRN immunoprecipitate over the eYFP immunoprecipitation background level (Figure 3, right panel) confirming the limit of detection of our mass spectrometry study. These results suggest that the interactions of POLR2A, POLR2B, HNRPK, MSH2, XRCC1, and Lamin B1 proteins in WRN-containing multiprotein complexes are highly dependent on the presence of nucleic acids.

Lachapelle and al., Figure 3

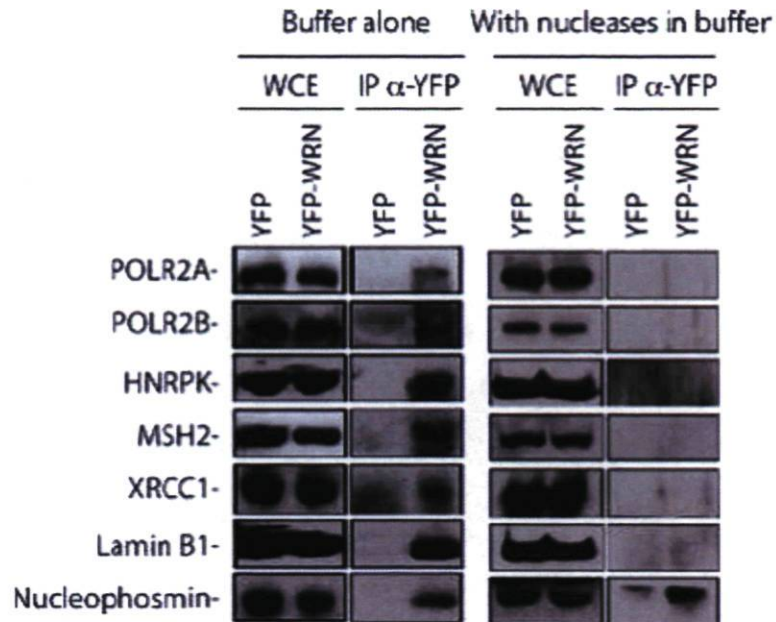


Figure 3. Co-immunoprecipitation of selected proteins with the eYFPWRN construct. Human 293 embryonic kidney cells were transfected with an eYFP or a eYFP-WRN expression vector. Whole cell extracts (WCE) were immunoprecipitated with an anti-eYFP antibody (IP_YFP). The immunoprecipitate was analyzed by immunoblotting with antibodies against POLR2A, POLR2B, HNRPK, MSH2, XRCC1 Lamin B1, and nucleophosmin. Panels on the left represent the Immunoprecipitation performed in the absence of nuclease. Panels on the right represent the immunoprecipitation performed in the presence of

2.3.4 Validation of RPS3 Interactions with Endogenous WRN

A good concordance between nuclease and non-nuclease treated immunoprecipitations was obtained for the top hits (see Supplementary Table S5). More importantly, in the nuclease treated immunoprecipitation, the top 15 hits are very plausible direct interactors of WRN as many of them were previously shown to bind WRN protein directly. These include DNA-PK (PRKDC) [Karmakar et al., 2002a; Yannone et al., 2001], XRCC5 (KU86) and XRCC6 (KU70) [Cooper et al., 2000; Li and Comai, 2000], DHX9 (DNA helicase II) [Chakraborty and Grosse], RPA1 [Brosh et al., 1999; Shen et al., 1998], LIG3 (DNA ligase III) [Sallmyr et al., 2008], and PARP-1 [Lebel et al., 2003; von Kobbe et al., 2003]. Out of the 40 proteins listed in Table 2, 30 of them are potentially new direct interactors of WRN protein. Among the top 15 hits, we find the new interactors TMPO, HNRNPU, RPS3, RALY, RPS9, DDX21, and HNRNPM. We focused our attention on RPS3, which is a ribosomal protein with endonuclease activities that is involved in oxidative DNA damage recognition [Hegde et al., 2006; Kim et al., 2005b; Yadavilli et al., 2007]. Increased oxidative stress has been described in WS patients [Pagano et al., 2005] and increase oxidative DNA damage has recently been described in mice with a deletion of part of the Wrn helicase domain [Labbe et al.; Massip et al.]. Furthermore, there is evidence that WRN stimulates repair of oxidative DNA base damage [Das et al., 2007]. We first validated the presence of this protein in the nuclease-treated eYFP-WRN immunoprecipitate. As indicated in Figure 4A, RPS3 was present in the eYFP-WRN immunoprecipitate and absent in the eYFP immunoprecipitate. We next examined whether we could co-immunoprecipitate these proteins with endogenous WRN protein in untransfected HEK 293 cells. As indicated in Figure 4B, RPS3 was co-immunoprecipitated with the endogenous WRN protein while a control IgG gave no signal. We also performed the reverse immunoprecipitation with an antibody against RPS3. As indicated in Figure 4B, WRN was co-immunoprecipitated with the endogenous RPS3. All immunoprecipitations were performed in the presence of Benzonase and RNase A. We also performed immunoprecipitation experiments on HEK 293 cells treated with different concentrations of hydrogen peroxide for 1 to 2 h. We did not detect an increase in the amount of WRN/RPS3 complex in the immunoprecipitates (data not shown). Additional stress conditions with different DNA damaging agents are warranted to determine the function of the WRN/RPS3 complex in cells.

Lachapelle and al., Figure 4

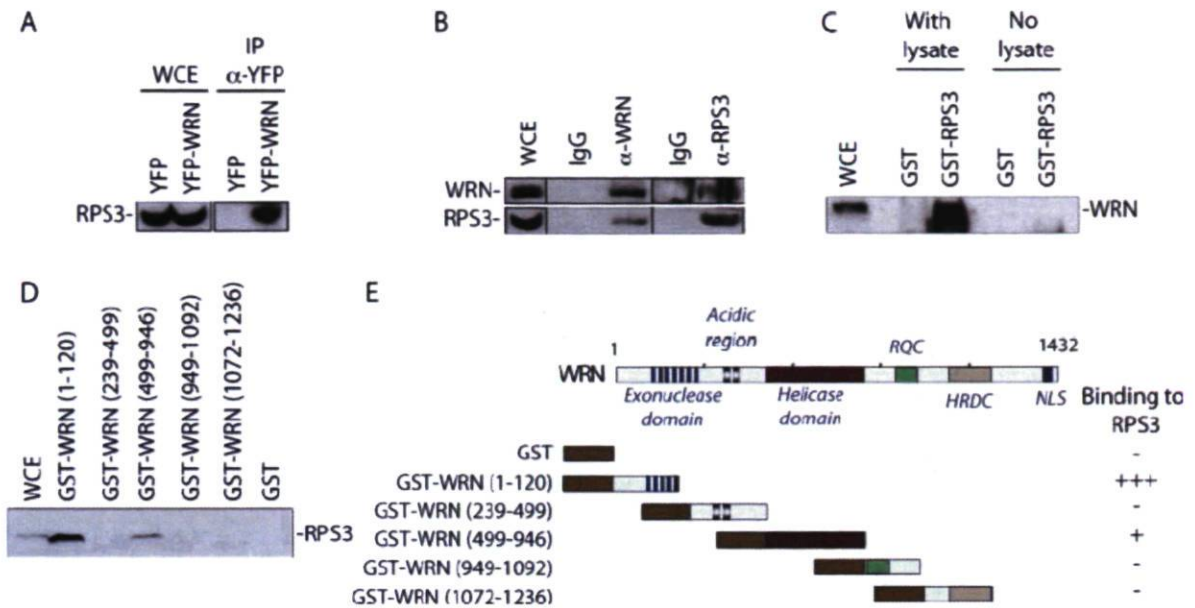


Figure 4. Interaction of RPS3 with the WRN protein. (A) Co-precipitation of RPS3 with the eYFP-WRN protein in HEK 293 cells. (WCE represents the whole cell extract.) (B) Co-immunoprecipitation of human RPS3 protein with endogenous WRN protein. Approximately 2 mg of proteins from HEK 293 cells was immunoprecipitated with antibodies against the C-terminus region of human WRN protein H300 from Santa Cruz Biotechnology. Control antibodies were of the same IgG species. The immunoprecipitates were analyzed by Western blotting with the anti-WRN antibody (WRN; top panel) and an antibody against RPS3. Proteins were revealed with an ECL kit. The anti-WRN antibody for the immunoblot is from Novus Biologicals. (C) Interaction of RPS3 with different domains of WRN in whole cell extract. Immunoblot against RPS3 protein bound to different GST-WRN affinity Sepharose beads. HEK 293 whole cell extracts were incubated with 50 μ g of the GST-WRN fragments or GST linked glutathione-sepharose beads overnight. Proteins bound to the affinity beads were analyzed by SDS-PAGE with antibodies against RPS3. (D) Interaction of WRN with RPS3 in whole cell extract. Immunoblot against WRN protein bound to GST-RPS3 but not GST affinity Sepharose beads. HEK 293 whole cell extracts were incubated with 50 μ g of the GST-RPS3 or GST linked glutathione-sepharose beads overnight. Proteins bound to the affinity beads were analyzed by SDS-PAGE with antibodies against WRN. (E) Schematic representation of different WRN fragments that were used in the WRN affinity chromatography experiments. Each domain of the WRN protein is indicated on the full WRN protein figure. The amino acid residues of the WRN fragments used in this study are indicated on the left of each construct. Binding of RPS3 is indicated on the right by the “+” sign. The “-” sign indicates no binding detected.

We next determined whether WRN could bind directly to a GST-RPS3 chimeric protein *in vitro*. As indicated in Figure 4C, WRN interacted directly to a GST-RPS3 construct but not to sepharose beads containing GST alone. Finally, we determined which region of WRN is required for RPS3 interaction. As indicated in Figure 4D, GST pull-down assays showed that RPS3 interacted strongly to a region of the WRN protein containing part of the exonuclease domain (amino acids 1_120) and more weakly to part of the helicase domain of WRN (amino acids 499_946) (summarized in Figure 4E). Overall, these experiments suggest that RPS3 interacts directly to WRN protein in cells.

2.4 Discussion

The greatest advantage of a proteome-wide study like the one presented here lies in the acceleration of the pace at which WRN-binding candidates are discovered compared with traditional approaches. By combining large-scale LC_MS/MS identification of immunoprecipitated eYFP-WRN-associated proteins and bioinformatics-based predictions, this study represents the first large-scale proteomic identification of WRN-binding proteins and provides insights into the pathways that can be modulated by WRN protein. Although these candidates will require additional validation, their disclosure opens up considerable opportunity for new hypothesis-driven experiments.

In this study, two approaches have been used to elucidate WRN's intermolecular interactions. The first approach was focused on a more global, systems-wide analysis of WRN complexes composition. While this approach is more likely to capture low affinity and transient interactions, it cannot rule out recruitment via nucleic acid tethering. Therefore, we adopted a second approach that minimizes physical interactions between WRN protein and nucleic acids. Many laboratories add ethidium bromide or nucleases to cell extraction procedures before the immunoprecipitation step. These strategies have been used on a case-by-case level to confirm that protein_protein interactions are not due to the presence of nucleic acids only. Here, we use this concept for the first time at a larger scale, with a complete proteomic analysis on human WRN. We did not use ethidium bromide in this study because there is evidence that such chemical intercalates into the minor groove of the DNA leading to a nucleic acid structure recognized by specific DNA binding proteins. For example, a recent study indicated that p53 has a higher affinity for DNA treated with

various concentrations of ethidium bromide [Pivonkova et al.]. We thus opted for broad-spectrum nucleases in our analyses. To our surprise, more than 80% of the WRN interactors were removed with the addition of Benzonase[®] and Rnase A prior to immunoprecipitation and mass spectrometry. The 40 co-immunoprecipitated proteins in the presence of nucleases are likely forming stable and direct protein-protein interaction complexes that persisted during all the purification steps. Our strategy is thus amenable to proteomics analysis of other nucleic acid binding proteins and serves as a cautionary note in identifying protein partners of nucleic acid binding proteins.

The major interactors of WRN identified in this study were the proteins of the nonhomologous end joining repair system (DNA-PKc and the KU70/86 complex). A role for WRN in end joining reaction has been established through other studies [Kusumoto et al., 2008], showing functional interactions between WRN and key factors in end joining. We did not detect all the proteins that have been experimentally shown to interact or to co-immunoprecipitate with the WRN protein in our system. For example, EXO1, RAD51, RAD52, and BRCA1 (for DNA recombination), APE1 and FEN1 (base excision repair) [Ahn et al., 2004; Baynton et al., 2003; Brosh et al., 2001b; Cheng et al., 2006; Otterlei et al., 2006; Sharma et al., 2003] were absent in our list (Table 1). This may be due to the fact that we used 293 embryonic kidney cells in unstressed conditions. Nevertheless, we did detect proteins involved in these repair pathways such as RAD50, SFPQ, and NONO for recombination [Rajesh et al., 2009] (when nucleases were omitted in the lysis buffers) or PARP-1, and DNA ligase 3 for base excision repair (even with the presence of nucleases in the lysis buffer). We also identified MSH2 and MSH3 (when no nucleases were added in the lysis buffer), which are involved in both mismatch repair and recombination pathways [Surtees and Alani, 2006] confirming a previous report [Saydam et al., 2007]. Several sister chromatid cohesion proteins, such as SMC1A, SMC3, and NIPBL, involved in DNA repair with BRCA1 were identified in the eYFP-WRN immunoprecipitate as well but only when nucleases were omitted in our lysis buffer [Revenkova et al., 2009; Strachan, 2005; Tonkin et al., 2004; Yazdi et al., 2002]. Finally, the ATR serine/threonine protein kinase involved in sensing double-strand breaks was also associated with the WRN protein based on our preliminary list. Similarly, we did not detect any DNA polymerase [Kamath-Loeb et al., 2000; Kamath-Loeb et al., 2007]. We did identify, however, several accessory proteins required for the activities of these polymerases such as several RFCs and RPAs, DHX9,

and topoisomerase I. These accessory proteins are likely to be direct interactors as they were present even in nucleic acids depleted extracts.

Interestingly, our results indicated that WRN also co-immunoprecipitated the POLR2A and POLR2B subunits of the RNA polymerase II transcriptional machinery. These results complement a study conducted a decade ago showing that purified WRN protein increases the transcription efficiency of a plasmid template bearing an RNA polymerase II-specific promoter in an *in vitro* assay [Balajee et al., 1999]. It is also in agreement with a report describing the importance of WRN protein in the transcription and thus the replication of the HIV-1 retrovirus [Sharma et al., 2007]. With nucleases in the buffers, however, both subunits of the RNA polymerase II machinery (POLR2A and POLR2B) were absent from the eYFP-WRN immunoprecipitates. It is possible that the WRN protein facilitates transcription by remodeling the chromatin structure or by simply changing the topology of the DNA [Turaga et al., 2007] in close proximity to some RNA polymerase subunits during transcription of specific genes without direct contact. Alternatively, WRN may interact directly to transcription factors during transcription which themselves interact directly with the RNA polymerase machinery. Several transcription factors or cofactors are in the new list of WRN interactors even in the presence of nucleases in the immunoprecipitates (SUPT16H, SSRP1, TFAM, PELP1). Validation and the significance of these potential interactions are warranted.

Except for RALY, the top 15 proteins associated with WRN were found in both nuclease treated and untreated immunoprecipitation experiments. Several of these interactions have been confirmed in the literature. We are thus confident that the mass spectrometry analyses on the eYFP-WRN immunoprecipitation containing Benzonase[®] and Rnase A have identified direct interactors of the WRN protein. Several proteins have never been reported as potential WRN interactors, although some may possess biologic activities that are consistent with known WRN functions (Table 3). An example of this is the identification of the highly abundant lamina-associated polypeptide 2-alpha (LAP2A/TMPO) as a putative WRN-interacting protein. LAP2A is likely involved in the dynamics of higher order chromatin organization. Indeed, Werner syndrome cells display a distorted nuclear shape phenotype [Adelfalk et al., 2005]. Another example is RPS3. RPS3 is a ribosomal protein

with endonuclease activities involved in oxidative DNA damage recognition in cells. As a proof of principle, we confirmed that RPS3 is a new direct interactor of the endogenous WRN protein as it can be co-immunoprecipitated by an anti-WRN antibody [Hegde et al., 2006; Kim et al., 2005b; Yadavilli et al., 2007]. Similarly, WRN can be co-immunoprecipitated with endogenous RPS3. Future experiments will be aimed at determining the impact of the WRN/RPS3 functions in cells as RPS3 bound two catalytic regions of WRN.

Table 3. Significant Statistical Biological Functions Associated with Proteins Identified by LC_MS/MS in eYFP-WRN Immunoprecipitates Treated with Nucleases As Revealed by PANTHER^a.

Nucleoside, nucleotide and nucleic acid metabolism ($P < 0.001$)

RALY, HIST1H2AB, XRCC5, XRCC6, PRKDC, RPA1, RPA2, TOP1, HNRNPM, DDX3X, HIST1H4A, DDX21, DHX9, SSRP1, HIST1H1E, TRIM28, DDX1, LIG3, SFRS1, RBMX, HNRNPU, RFC4, SUPT16H, PARP-1, THOC1, BAT1, PELP1, TFAM.

DNA metabolism ($P < 0.001$)

RPA1, XRCC5, RPA2, TOP1, RFC4, XRCC6, LIG3, PRKDC, PARP-1.

DNA repair ($P < 0.001$)

XRCC5, RPA2, XRCC6, LIG3, PRKDC, PARP-1, RPS3.

Pre-mRNA processing ($P < 0.001$)

RALY, HNRNPM, DHX9, SFRS1, RBMX, HNRNPUL2.

DNA replication ($P < 0.005$)

RPA1, RPA2, TOP1, RFC4.

Chromatin packaging and remodeling ($P < 0.012$)

HIST1H2AB, HIST1H1E, HIST1H4A, TRIM28, HIST1H2BK.

Protein biosynthesis and processing ($P < 0.027$)

RPS3A, RPS9, RPL5, RPL11, RPS3, HERC2, HSPA5, CCT8.

^aNot in this list: TMPO for nuclear structure; PELP1 and TFAM for transcription; VRK3 for signal transduction.

Not in this list: TMPO for nuclear structure; PELP1 and TFAM for transcription; VRK3 for signal transduction.

Acknowledgment

This work was supported by the Canadian Institutes of Health Research to G.G.P., J.-Y.M., and M.L. J.-Y.M. and M.L. are senior scholars from the Fonds de la Recherche en Santé du Québec

Supplementary material available at: <http://pubs.acs.org/doi/suppl/10.1021/pr100990s>

Chapitre III

Discussion

Dans un premier temps, cette étude visait à démontrer qu'il existe d'autres partenaires que ceux déjà connus qui jouent un rôle important, pour la protéine défectueuse dans le syndrome de Werner. Avec les nouvelles technologies en constante évolution, il est désormais possible d'identifier les partenaires potentiels d'une protéine beaucoup plus rapidement qu'avec les méthodes traditionnelles. En combinant la Spectrométrie de masse en tandem à chromatographie liquide (LC-MS/MS) à une immunoprécipitation des protéines associées à eYFP-WRN et finalement à une analyse basée sur des prédictions bioinformatiques, il est possible de fournir des pistes solides pour diriger une étude vers des partenaires protéiques et des sentiers que la protéine pourrait influencer. Dans le cas de la protéine WRN, il s'agit de la première étude réalisée dans un aussi large spectre. Toutefois, il est important d'apporter des analyses complémentaires pour confirmer chacune des nouvelles interactions de partenaires découvertes.

Dans l'optique de trouver de nouveaux partenaires, les premiers résultats obtenus sans l'utilisation de nucléases à large spectre, ont fourni une liste très étendue et manquant de spécificité. En effet, mise à part la purification par les billes, rien ne prouvait qu'il s'agissait effectivement d'interactions directes entre les protéines trouvées et la protéine WRN. Rien n'excluait la possibilité que les protéines soient tout simplement prisonnières des acides nucléiques contaminants ou des protéines liant les acides nucléiques présents lors de l'immunoprécipitation. Il était alors impossible de donner une direction aux résultats et de poser des hypothèses quant à l'implication de WRN dans un potentiel aussi large de complexes protéiques impliqués dans le métabolisme des acides nucléiques. Afin d'ajouter plus de spécificité aux résultats, il a donc été décidé de recommencer les manipulations, en ajoutant cette fois-ci la Rnase A en plus de la Benzonase®, des nucléases à large spectre. En ajoutant de telles nucléases agissant de façon aussi étendue, il était dès lors possible d'éliminer pratiquement toutes traces d'acides nucléiques pouvant contaminer nos échantillons. Ainsi, la liste obtenue était constituée de protéines pouvant être des partenaires potentiels directs de WRN et était beaucoup plus spécifique. Plusieurs partenaires déjà connus et démontrés de WRN sont ressortis, ce qui vient appuyer nos observations.

La protéine WRN est impliquée dans plusieurs mécanismes de réparation de l'ADN (révisé dans [Rossi et al.] 2010). En accord avec ces données, parmi les plus importantes protéines partenaires de WRN, selon notre liste, figurent les protéines DNA-PKcs et KU70/86 qui sont des membres du NHEJ. Les résultats de nos études viennent confirmer d'importants partenaires protéiques déjà démontrés lors d'autres études [Kusumoto et al., 2008; Opreško et al., 2003]. Puisque les immunoprécipitations n'ont pas été effectuées lors de situations de stress pour les cellules, il est normal de ne pas retrouver certains partenaires et membres importants, même si ceux-ci ont déjà été démontrés comme interagissant directement avec WRN. Comme mentionné dans l'introduction, des études démontrent, par exemple, l'interaction entre WRN et BRCA1, RAD51 (réparation de recombinaison), APE1 et FEN1 (REB), cependant ces protéines ne se retrouvent pas dans notre liste de partenaires découverts à partir de cellules non stressées [Ahn et al., 2004; Brosh et al., 2001b; Cheng et al., 2006; Sakamoto et al., 2001]. Par contre, plusieurs partenaires impliqués dans ces mêmes mécanismes de réparation font aussi partie de la liste à la suite de l'analyse, que ce soit en absence des nucléases comme c'est le cas pour RAD50, pour la protéine SFPQ et pour la protéine NONO (mécanismes de recombinaison) [Rajesh et al., 2009] ou même en présence de nucléases comme c'est le cas pour PARP-1 ou la protéine DNA-ligase 3 (REB) [Leppard et al., 2003]. Dans le même sens, les protéines MSH2 et MSH3, qui sont impliquées dans la réparation par mésappariement, ont été identifiées dans la première série de tests sans la présence de nucléases [Watanabe et al., 1996]. Toujours dans les mécanismes de réparation, plusieurs protéines de cohésion de chromatides soeurs telles que SMC1A, SMC3 et NIPBL, qui sont impliquées dans la réparation de l'ADN avec BRCA1 furent identifiées à partir de l'immunoprécipitation de eYFP-WRN, mais pour elles aussi seulement en l'absence de nucléases [Saydam et al., 2007]. C'est aussi le cas de la protéine kinase ATR sérine/thréonine décrite dans l'introduction, qui n'a été retrouvée que dans la liste des partenaires potentiels de WRN sans la présence de nucléases. Des protéines accessoires requises pour le fonctionnement des polymérase à ADN, telles que RFCs and RPAs, DHX9 et topoisomérase I furent identifiées et sont fort possiblement des partenaires directs de la protéine WRN, puisqu'elles sont aussi présentes même avec la dégradation des acides nucléiques [Kamath-Loeb et al., 2000; Kamath-Loeb et al., 2007].

Beaucoup de partenaires de la liste appartiennent à différents sentiers de réparation, mais il faut également mentionner que des protéines d'autres sentiers sont ressorties de nos expérimentations. En effet, des protéines participant à la transcription ont également été détectées comme pouvant être des partenaires potentiels de WRN. Cela vient soutenir l'hypothèse de l'influence de WRN dans les mécanismes transcriptionnels. En lien avec ces données, les protéines POLR2A et POLR2B, qui sont des sous-unités de la machinerie transcriptionnelle de la polymérase II à ARN sont apparues la liste des partenaires potentiels de WRN sans la présence de nucléases. Malheureusement, celles-ci n'ont pas été retrouvées dans la liste suite à l'ajout de Benzonase® et de RNase A. Il n'est pas impossible que l'interaction soit alors indirecte et qu'elle ait été fait suite à un remodelage de la chromatine ou un remodelage de la topologie de l'ADN par la protéine WRN. Toutefois, des facteurs ou cofacteurs de la transcription, tels que SUPT16H, SSRP1, TFAM et PELP1 sont restés présents, même après l'ajout des nucléases.

Ces résultats sont intéressants, autant pour les protéines de réparation que pour les protéines appartenant à d'autres fonctions. En effet, en plus d'apporter des confirmations supplémentaires au sujet des partenaires de WRN qui avaient déjà été identifiés dans d'autres études et par des techniques différentes, ces résultats amènent aussi des pistes particulièrement intéressantes pour les sentiers que WRN pourrait influencer ou réguler ou encore y participer. Par exemple, la présence de facteur de transcription dans notre liste de protéines interagissant avec la protéine WRN suggère que cette dernière est impliqué au niveau de la transcription.

Ces résultats ne sont, cependant, pas suffisants pour affirmer avec certitude qu'il s'agisse bel et bien de nouveaux partenaires de WRN. Les résultats sont basés sur des comparaisons de bases de données et d'algorithmes informatiques, mais peuvent tout de même diverger des résultats qui seraient obtenus par des techniques différentes. Cela est d'autant plus vrai qu'il ne s'agissait pas de la protéine WRN endogène, mais bien d'une amplification de notre protéine d'intérêt introduite par transfection jointe à un plasmide possédant une étiquette peptide fluorescent permettant d'aller récupérer plus facilement la protéine surexprimée. Il est donc important que les nouveaux partenaires, pour lesquelles

l'interaction était jusqu'alors inconnue, soient analysées plus en profondeur avec les protéines endogènes. La co-immunoprécipitation des protéines à partir de fractions cellulaires est l'une des techniques les plus convaincantes pour mettre en évidence l'interaction physique *in vivo* de deux ou plusieurs protéines [Monti et al., 2005; Ren et al., 2003]. Ainsi, une co-immunoprécipitation avec la protéine WRN endogène a été utilisée pour venir confirmer l'interaction directe avec la protéine ribosomale S3 (RPS3).

La plupart des interactions avec les partenaires les plus abondants de WRN sont déjà bien décrites. Nous avons choisi ici de vérifier et de confirmer l'interaction directe entre WRN et la protéine RPS3. En effet, l'utilité de connaître les partenaires de la principale protéine responsable du syndrome de WRN est d'expliquer plus en détail les sentiers qui sont affectés par la perte de fonctionnalité de cette dernière. Bien que plusieurs partenaires protéiques pourraient expliquer les cas de cancers dans le SW, peu d'entre elles apportent des explications solides et détaillées par rapport aux autres symptômes décrits pour le SW, tels que le vieillissement prématuré, le diabète, l'évolution rapide de troubles cardiaques ou même l'athérosclérose [Leistriz et al., 1993; Ozgenc and Loeb, 2006].

La protéine RPS3 est une composante primordiale de la petite sous-unité ribosomale S40 et elle est impliquée dans la maturation de cette dernière [Schafer et al., 2006]. Des arguments viennent aussi appuyer le fait que RPS3 serait une protéine possédant plusieurs fonctions différentes et ce, au-delà de sa participation dans le ribosome. En effet, des études démontrent sa participation dans la réparation de l'ADN, la transcription, les métastases et l'apoptose [Jang et al., 2004; Kim et al., 2005a; Kim and Kim, 2006; Kim et al., 2005b; Kim et al., 2009; Wan et al., 2007]. Au niveau cellulaire, la protéine RPS3 est cytosolique, mais des études démontrent que RPS3 est en mesure de bouger vers le noyau sous l'influence de différents mécanismes ou perturbations cellulaires. En effet, la majorité de la protéine RPS3 se trouve attachée au complexe ribosomal ou en suspension dans le cytosol, mais sous l'influence d'un stress oxydatif, une certaine quantité des protéines en suspension dans le cytoplasme se déplacent au noyau suite à la phosphorylation par ERK 1/2 dans la levure et par PKC delta chez l'humain [Schafer et al., 2006; Wykoff and O'Shea, 2005; Yadavilli et al., 2007]. L'une des propriétés importantes de la protéine RPS3 est de lier

avec une grande affinité les sites 8-oxoG générés par des stress oxydatifs sur les molécules d'ADN. Le vieillissement, le diabète, les troubles cardiaques et l'athérosclérose sont tous liés d'une façon ou d'une autre au stress oxydatif de source endogène ou exogène. La capacité de réparation par le mécanisme de REB diminue avec l'âge, et celle-ci est accompagnée du déclin de l'activité de la protéine 8-Oxoguanine-DNA glycosylase (OGG1) [Chen et al., 2003]. En conséquence, il y a une accumulation de lésions 8-oxoguanine avec l'âge [Chen et al., 2003; Miura and Endo]. Une étude établit une corrélation entre le rythme de génération des espèces réactives oxygénées et la durée de vie. Les résultats indiquent qu'elles représentent un des déterminants majeurs du vieillissement et du développement de multiples maladies associées à l'âge [Finkel and Holbrook, 2000; Squier, 2001]. Par ailleurs, le stress oxydatif est impliqué dans les complications vasculaires menant éventuellement à d'importants troubles cardiaques. Son implication est aussi connue dans les complications liant la production de superoxydes avec le diabète. Finalement, certaines théories impliquent le stress oxydatif dans les causes possibles de l'athérosclérose [Blasi, 2008; Da Ros et al., 2005; Lambeth, 2007; Squier, 2001]. Ainsi, la protéine RPS3 représente un nouveau partenaire protéique très intéressant. L'utilisation de la co-immunoprécipitation de WRN et de RPS3 nous a permis de confirmer l'interaction *in vivo* entre WRN et RPS3. Afin d'apporter davantage de caractérisations, nous avons utilisé la technique *in vitro* de purification à l'aide de billes GST et de fragments des domaines d'interactions de la protéine WRN. Cette technique nous a permis d'abord d'apporter une confirmation supplémentaire de l'interaction directe entre les deux protéines, en plus d'identifier quels domaines de WRN interagissent avec RPS3. Un autre argument qui rend la découverte de cette interaction intéressante est le fait que les deux protéines, WRN et RPS3 partagent d'autres sentiers communs. Tout comme WRN, la protéine RPS3 est impliquée dans les sentiers régulés par p53. Ainsi, une étude démontre que RPS3 interagit avec p53 pour le protéger de l'ubiquitination régulée par la protéine MDM2 [Yadavilli et al., 2007].

Bien qu'une interaction directe ait été découverte et confirmée par différentes techniques, il serait intéressant dans le futur de caractériser davantage celle-ci dans des études futures. En effet, il se pourrait que le fait d'utiliser différentes conditions de stress sur les cellules

puisse apporter des informations considérables sur le rôle de cette interaction. La première condition à analyser, qui leur est commune, est le stress oxydatif. Il faudra alors déterminer la dose à utiliser qui permettra de visualiser si le recrutement des protéines, l'une par rapport à l'autre, varie en évitant d'induire la mort cellulaire. De plus, il serait intéressant de caractériser l'impact physiologique des variations de ces deux protéines en générant des croisements entre différents modèles de souris, dont la production des protéines WRN ou RPS3 a été génétiquement manipulée.

Bibliographie

Abdelhaleem M. Helicases: an overview. *Methods Mol Biol* 587:1-12.

Abraham RT. 2001. Cell cycle checkpoint signaling through the ATM and ATR kinases. *Genes Dev* 15:2177-96.

Adelfalk C, Kontou M, Hirsch-Kauffmann M, Schweiger M. 2003. Physical and functional interaction of the Werner syndrome protein with poly-ADP ribosyl transferase. *FEBS Lett* 554:55-8.

Adelfalk C, Scherthan H, Hirsch-Kauffmann M, Schweiger M. 2005. Nuclear deformation characterizes Werner syndrome cells. *Cell Biol Int* 29:1032-7.

Agatson SA, Gartner S. 1939. Precocious cataracts and scleroderma (Rothmund's syndrome; Werner's syndrome). *Arch Ophthalmol* 21:492-96.

Ahn B, Harrigan JA, Indig FE, Wilson DM, 3rd, Bohr VA. 2004. Regulation of WRN helicase activity in human base excision repair. *J Biol Chem* 279:53465-74.

Avila-Funes JA, Gray-Donald K, Payette H. 2008. Association of nutritional risk and depressive symptoms with physical performance in the elderly: the Quebec longitudinal study of nutrition as a determinant of successful aging (NuAge). *J Am Coll Nutr* 27:492-8.

Bachrati CZ, Hickson ID. 2003. RecQ helicases: suppressors of tumorigenesis and premature aging. *Biochem J* 374:577-606.

Baird DM, Davis T, Rowson J, Jones CJ, Kipling D. 2004. Normal telomere erosion rates at the single cell level in Werner syndrome fibroblast cells. *Hum Mol Genet* 13:1515-24.

Balajee AS, Machwe A, May A, Gray MD, Oshima J, Martin GM, Nehlin JO, Brosh R, Orren DK, Bohr VA. 1999. The Werner syndrome protein is involved in RNA polymerase II transcription. *Mol Biol Cell* 10:2655-68.

Baynton K, Otterlei M, Bjoras M, von Kobbe C, Bohr VA, Seeberg E. 2003. WRN interacts physically and functionally with the recombination mediator protein RAD52. *J Biol Chem* 278:36476-86.

Berlett BS, Stadtman ER. 1997. Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. *J Biol Chem* 272:20313-6.

Blackburn EH. 1984. The molecular structure of centromeres and telomeres. *Annu Rev Biochem* 53:163-94.

Blackburn EH. 2001. Switching and signaling at the telomere. *Cell* 106:661-73.

- Blander G, Kipnis J, Leal JF, Yu CE, Schellenberg GD, Oren M. 1999. Physical and functional interaction between p53 and the Werner's syndrome protein. *J Biol Chem* 274:29463-9.
- Blasi C. 2008. The autoimmune origin of atherosclerosis. *Atherosclerosis* 201:17-32.
- Brosh RM, Jr., Bohr VA. 2002. Roles of the Werner syndrome protein in pathways required for maintenance of genome stability. *Exp Gerontol* 37:491-506.
- Brosh RM, Jr., Bohr VA. 2007. Human premature aging, DNA repair and RecQ helicases. *Nucleic Acids Res* 35:7527-44.
- Brosh RM, Jr., Driscoll HC, Dianov GL, Sommers JA. 2002. Biochemical characterization of the WRN-FEN-1 functional interaction. *Biochemistry* 41:12204-16.
- Brosh RM, Jr., Karmakar P, Sommers JA, Yang Q, Wang XW, Spillare EA, Harris CC, Bohr VA. 2001a. p53 Modulates the exonuclease activity of Werner syndrome protein. *J Biol Chem* 276:35093-102.
- Brosh RM, Jr., Orren DK, Nehlin JO, Ravn PH, Kenny MK, Machwe A, Bohr VA. 1999. Functional and physical interaction between WRN helicase and human replication protein A. *J Biol Chem* 274:18341-50.
- Brosh RM, Jr., von Kobbe C, Sommers JA, Karmakar P, Opresko PL, Piotrowski J, Dianova I, Dianov GL, Bohr VA. 2001b. Werner syndrome protein interacts with human flap endonuclease 1 and stimulates its cleavage activity. *EMBO J* 20:5791-801.
- Buisson R, Dion-Cote AM, Coulombe Y, Launay H, Cai H, Stasiak AZ, Stasiak A, Xia B, Masson JY. Cooperation of breast cancer proteins PALB2 and piccolo BRCA2 in stimulating homologous recombination. *Nat Struct Mol Biol* 17:1247-54.
- Burkle A. 2001. Poly(APD-ribosyl)ation, a DNA damage-driven protein modification and regulator of genomic instability. *Cancer Lett* 163:1-5.
- Campisi J, Kim SH, Lim CS, Rubio M. 2001. Cellular senescence, cancer and aging: the telomere connection. *Exp Gerontol* 36:1619-37.
- Carney JP, Maser RS, Olivares H, Davis EM, Le Beau M, Yates JR, 3rd, Hays L, Morgan WF, Petrini JH. 1998. The hMre11/hRad50 protein complex and Nijmegen breakage syndrome: linkage of double-strand break repair to the cellular DNA damage response. *Cell* 93:477-86.
- Castro L, Freeman BA. 2001. Reactive oxygen species in human health and disease. *Nutrition* 17:161, 163-5.
- Celli GB, Denchi EL, de Lange T. 2006. Ku70 stimulates fusion of dysfunctional telomeres yet protects chromosome ends from homologous recombination. *Nat Cell Biol* 8:885-90.

- Chakraborty P, Grosse F. WRN helicase unwinds Okazaki fragment-like hybrids in a reaction stimulated by the human DDX9 helicase. *Nucleic Acids Res* 38:4722-30.
- Chang S, Multani AS, Cabrera NG, Naylor ML, Laud P, Lombard D, Pathak S, Guarente L, DePinho RA. 2004. Essential role of limiting telomeres in the pathogenesis of Werner syndrome. *Nat Genet* 36:877-82.
- Chen L, Oshima J. 2002. Werner Syndrome. *J Biomed Biotechnol* 2:46-54.
- Chen SK, Hsieh WA, Tsai MH, Chen CC, Hong AI, Wei YH, Chang WP. 2003. Age-associated decrease of oxidative repair enzymes, human 8-oxoguanine DNA glycosylases (hOgg1), in human aging. *J Radiat Res (Tokyo)* 44:31-5.
- Cheng RZ, Murano S, Kurz B, Shmookler Reis RJ. 1990. Homologous recombination is elevated in some Werner-like syndromes but not during normal in vitro or in vivo senescence of mammalian cells. *Mutat Res* 237:259-69.
- Cheng WH, Kusumoto R, Opresko PL, Sui X, Huang S, Nicolette ML, Paull TT, Campisi J, Seidman M, Bohr VA. 2006. Collaboration of Werner syndrome protein and BRCA1 in cellular responses to DNA interstrand cross-links. *Nucleic Acids Res* 34:2751-60.
- Cheng WH, Muftic D, Muftuoglu M, Dawut L, Morris C, Helleday T, Shiloh Y, Bohr VA. 2008. WRN is required for ATM activation and the S-phase checkpoint in response to interstrand cross-link-induced DNA double-strand breaks. *Mol Biol Cell* 19:3923-33.
- Cheng WH, von Kobbe C, Opresko PL, Arthur LM, Komatsu K, Seidman MM, Carney JP, Bohr VA. 2004. Linkage between Werner syndrome protein and the Mre11 complex via Nbs1. *J Biol Chem* 279:21169-76.
- Cobb JA, Bjergbaek L. 2006. RecQ helicases: lessons from model organisms. *Nucleic Acids Res* 34:4106-14.
- Constantinou A, Tarsounas M, Karow JK, Brosh RM, Bohr VA, Hickson ID, West SC. 2000. Werner's syndrome protein (WRN) migrates Holliday junctions and co-localizes with RPA upon replication arrest. *EMBO Rep* 1:80-4.
- Cooper MP, Machwe A, Orrsen DK, Brosh RM, Ramsden D, Bohr VA. 2000. Ku complex interacts with and stimulates the Werner protein. *Genes Dev* 14:907-12.
- Da Ros R, Assaloni R, Ceriello A. 2005. Molecular targets of diabetic vascular complications and potential new drugs. *Curr Drug Targets* 6:503-9.
- Das A, Boldogh I, Lee JW, Harrigan JA, Hegde ML, Piotrowski J, de Souza Pinto N, Ramos W, Greenberg MM, Hazra TK, Mitra S, Bohr VA. 2007. The human Werner syndrome protein stimulates repair of oxidative DNA base damage by the DNA glycosylase NEIL1. *J Biol Chem* 282:26591-602.
- de Lange T. 2002. Protection of mammalian telomeres. *Oncogene* 21:532-40.

- de Murcia JM, Niedergang C, Trucco C, Ricoul M, Dutrillaux B, Mark M, Oliver FJ, Masson M, Dierich A, LeMeur M, Walztinger C, Chambon P, de Murcia G. 1997. Requirement of poly(ADP-ribose) polymerase in recovery from DNA damage in mice and in cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:7303-7.
- DeMott MS, Zigman S, Bambara RA. 1998. Replication protein A stimulates long patch DNA base excision repair. *J Biol Chem* 273:27492-8.
- Dianov GL, Prasad R, Wilson SH, Bohr VA. 1999. Role of DNA polymerase beta in the excision step of long patch mammalian base excision repair. *J Biol Chem* 274:13741-3.
- Dong Y, Hakimi MA, Chen X, Kumaraswamy E, Cooch NS, Godwin AK, Shiekhattar R. 2003. Regulation of BRCC, a holoenzyme complex containing BRCA1 and BRCA2, by a signalosome-like subunit and its role in DNA repair. *Mol Cell* 12:1087-99.
- Dornreiter I, Erdile LF, Gilbert IU, von Winkler D, Kelly TJ, Fanning E. 1992. Interaction of DNA polymerase alpha-primase with cellular replication protein A and SV40 T antigen. *EMBO J* 11:769-76.
- Ellis NA, Groden J, Ye TZ, Straughen J, Lennon DJ, Ciocci S, Proytcheva M, German J. 1995. The Bloom's syndrome gene product is homologous to RecQ helicases. *Cell* 83:655-66.
- Epstein CJ, Martin GM, Schultz AL, Motulsky AG. 1966. Werner's syndrome a review of its symptomatology, natural history, pathologic features, genetics and relationship to the natural aging process. *Medicine (Baltimore)* 45:177-221.
- Farrelly C. 2008. A tale of two strategies. The moral imperative to tackle ageing. *EMBO Rep* 9:592-5.
- Featherstone C, Jackson SP. 1999. Ku, a DNA repair protein with multiple cellular functions? *Mutat Res* 434:3-15.
- Finkel T, Holbrook NJ. 2000. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature* 408:239-47.
- Fry M. 2002. The Werner syndrome helicase-nuclease--one protein, many mysteries. *Sci Aging Knowledge Environ* 2002:re2.
- Fukuichi K, Martin GM, Monnat RJ, Jr. 1989. Mutator phenotype of Werner Syndrome is characterized by extensive deletions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86:5893-97.
- German J. 1993. Bloom syndrome: a mendelian prototype of somatic mutational disease. *Medicine (Baltimore)* 72:393-406.
- Ghosh A, Rossi ML, Aulds J, Croteau D, Bohr VA. 2009. Telomeric D-loops containing 8-oxo-2'-deoxyguanosine are preferred substrates for Werner and Bloom syndrome helicases and are bound by POT1. *J Biol Chem* 284:31074-84.

- Goto M. 1997. Hierarchical deterioration of body systems in Werner's syndrome: implications for normal ageing. *Mech Ageing Dev* 98:239-54.
- Goto M, Kato Y. 1995. Hypercoagulable state indicates an additional risk factor for atherosclerosis in Werner's syndrome. *Thromb Haemost* 73:576-8.
- Goto M, Kindynis P, Resnick D, Sartoris DJ. 1989. Osteosclerosis of the phalanges in Werner syndrome. *Radiology* 172:841-3.
- Goto M, Nishioka K. 1989. Age- and sex-related changes of the lymphocyte subsets in healthy individuals: an analysis by two-dimensional flow cytometry. *J Gerontol* 44:M51-6.
- Goto M, Rubenstein M, Weber J, Woods K, Drayna D. 1992. Genetic linkage of Werner's syndrome to five markers on chromosome 8. *Nature* 355:735-8.
- Goto M, Tanimoto K, Horiuchi Y, Kuwata T. 1982. Reduced natural killer cell activity of lymphocytes from patients with Werner's syndrome and recovery of its activity by purified human leucocyte interferon. *Scand J Immunol* 15:389-97.
- Goto M, Tanimoto K, Horiuchi Y, Sasazuki T. 1981. Family analysis of Werner's syndrome: a survey of 42 Japanese families with a review of the literature. *Clin Genet* 19:8-15.
- Gray MD, Shen JC, Kamath-Loeb AS, Blank A, Sopher BL, Martin GM, Oshima J, Loeb LA. 1997. The Werner syndrome protein is a DNA helicase. *Nat Genet* 17:100-3.
- Greider CW. 1996. Telomere length regulation. *Annu Rev Biochem* 65:337-65.
- Greider CW, Blackburn EH. 1996. Telomeres, telomerase and cancer. *Sci Am* 274:92-7.
- Griffith JD, Comeau L, Rosenfield S, Stansel RM, Bianchi A, Moss H, de Lange T. 1999. Mammalian telomeres end in a large duplex loop. *Cell* 97:503-14.
- Guay D, Gaudreault I, Massip L, Lebel M. 2006. Formation of a nuclear complex containing the p53 tumor suppressor, YB-1, and the Werner syndrome gene product in cells treated with UV light. *Int J Biochem Cell Biol* 38:1300-13.
- Haince JF, McDonald D, Rodrigue A, Dery U, Masson JY, Hendzel MJ, Poirier GG. 2008. PARP1-dependent kinetics of recruitment of MRE11 and NBS1 proteins to multiple DNA damage sites. *J Biol Chem* 283:1197-208.
- Hanada K, Hickson ID. 2007. Molecular genetics of RecQ helicase disorders. *Cell Mol Life Sci* 64:2306-22.
- Hanada K, Ukita T, Kohno Y, Saito K, Kato J, Ikeda H. 1997. RecQ DNA helicase is a suppressor of illegitimate recombination in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:3860-5.

- Harrigan JA, Opresko PL, von Kobbe C, Kedar PS, Prasad R, Wilson SH, Bohr VA. 2003. The Werner syndrome protein stimulates DNA polymerase beta strand displacement synthesis via its helicase activity. *J Biol Chem* 278:22686-95.
- Harrigan JA, Wilson DM, 3rd, Prasad R, Opresko PL, Beck G, May A, Wilson SH, Bohr VA. 2006. The Werner syndrome protein operates in base excision repair and cooperates with DNA polymerase beta. *Nucleic Acids Res* 34:745-54.
- Hayflick L. 1965. The Limited in Vitro Lifetime of Human Diploid Cell Strains. *Exp Cell Res* 37:614-36.
- Hegde V, Wang M, Mian IS, Spyres L, Deutsch WA. 2006. The high binding affinity of human ribosomal protein S3 to 7,8-dihydro-8-oxoguanine is abrogated by a single amino acid change. *DNA Repair (Amst)* 5:810-5.
- Hu JS, Feng H, Zeng W, Lin GX, Xi XG. 2005. Solution structure of a multifunctional DNA- and protein-binding motif of human Werner syndrome protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:18379-84.
- Huang S, Lee L, Hanson NB, Lenaerts C, Hoehn H, Poot M, Rubin CD, Chen DF, Yang CC, Juch H, Dorn T, Spiegel R, Oral EA, Abid M, Battisti C, Lucci-Cordisco E, Neri G, Steed EH, Kidd A, Isley W, Showalter D, Vittone JL, Konstantinow A, Ring J, Meyer P, Wenger SL, von Herbay A, Wollina U, Schuelke M, Huizenga CR, Leistritz DF, Martin GM, Mian IS, Oshima J. 2006. The spectrum of WRN mutations in Werner syndrome patients. *Hum Mutat* 27:558-67.
- Huang S, Li B, Gray MD, Oshima J, Mian IS, Campisi J. 1998. The premature ageing syndrome protein, WRN, is a 3'-->5' exonuclease. *Nat Genet* 20:114-6.
- Imoto S, Patro JN, Jiang YL, Oka N, Greenberg MM. 2006. Synthesis, DNA polymerase incorporation, and enzymatic phosphate hydrolysis of formamidopyrimidine nucleoside triphosphates. *J Am Chem Soc* 128:14606-11.
- Jang CY, Lee JY, Kim J. 2004. Rps3, a DNA repair endonuclease and ribosomal protein, is involved in apoptosis. *FEBS Lett* 560:81-5.
- Jonsson ZO, Hubscher U. 1997. Proliferating cell nuclear antigen: more than a clamp for DNA polymerases. *Bioessays* 19:967-75.
- Takechi T, Kuzuya H, Yoshimasa Y, Yamada K, Okamoto M, Nishimura H, Imura H. 1988. Binding and tyrosine kinase activities of the insulin receptor on Epstein-Barr virus transformed lymphocytes from patients with Werner's syndrome. *J Gerontol* 43:M40-5.
- Kamath-Loeb AS, Johansson E, Burgers PM, Loeb LA. 2000. Functional interaction between the Werner Syndrome protein and DNA polymerase delta. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:4603-8.

- Kamath-Loeb AS, Lan L, Nakajima S, Yasui A, Loeb LA. 2007. Werner syndrome protein interacts functionally with translesion DNA polymerases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:10394-9.
- Kamath-Loeb AS, Loeb LA, Johansson E, Burgers PM, Fry M. 2001. Interactions between the Werner syndrome helicase and DNA polymerase delta specifically facilitate copying of tetraplex and hairpin structures of the d(CGG)_n trinucleotide repeat sequence. *J Biol Chem* 276:16439-46.
- Kamath-Loeb AS, Shen JC, Loeb LA, Fry M. 1998. Werner syndrome protein. II. Characterization of the integral 3' → 5' DNA exonuclease. *J Biol Chem* 273:34145-50.
- Karmakar P, Piotrowski J, Brosh RM, Jr., Sommers JA, Miller SP, Cheng WH, Snowden CM, Ramsden DA, Bohr VA. 2002a. Werner protein is a target of DNA-dependent protein kinase in vivo and in vitro, and its catalytic activities are regulated by phosphorylation. *J Biol Chem* 277:18291-302.
- Karmakar P, Snowden CM, Ramsden DA, Bohr VA. 2002b. Ku heterodimer binds to both ends of the Werner protein and functional interaction occurs at the Werner N-terminus. *Nucleic Acids Res* 30:3583-91.
- Keller A, Nesvizhskii AI, Kolker E, Aebersold R. 2002. Empirical statistical model to estimate the accuracy of peptide identifications made by MS/MS and database search. *Anal Chem* 74:5383-92.
- Kim HD, Lee JY, Kim J. 2005a. Erk phosphorylates threonine 42 residue of ribosomal protein S3. *Biochem Biophys Res Commun* 333:110-5.
- Kim SH, Kim J. 2006. Reduction of invasion in human fibrosarcoma cells by ribosomal protein S3 in conjunction with Nm23-H1 and ERK. *Biochim Biophys Acta* 1763:823-32.
- Kim SH, Lee JY, Kim J. 2005b. Characterization of a wide range base-damage-endonuclease activity of mammalian rpS3. *Biochem Biophys Res Commun* 328:962-7.
- Kim TK. 1997. In vitro transcriptional activation of p21 promoter by p53. *Biochem Biophys Res Commun* 234:300-2.
- Kim TS, Kim HD, Kim J. 2009. PKCdelta-dependent functional switch of rpS3 between translation and DNA repair. *Biochim Biophys Acta* 1793:395-405.
- Kitano K, Yoshihara N, Hakoshima T. 2007. Crystal structure of the HRDC domain of human Werner syndrome protein, WRN. *J Biol Chem* 282:2717-28.
- Kitao S, Ohsugi I, Ichikawa K, Goto M, Furuichi Y, Shimamoto A. 1998. Cloning of two new human helicase genes of the RecQ family: biological significance of multiple species in higher eukaryotes. *Genomics* 54:443-52.

- Kudlow BA, Kennedy BK, Monnat RJ, Jr. 2007. Werner and Hutchinson-Gilford progeria syndromes: mechanistic basis of human progeroid diseases. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8:394-404.
- Kupper JH, Muller M, Jacobson MK, Tatsumi-Miyajima J, Coyle DL, Jacobson EL, Burkle A. 1995. trans-dominant inhibition of poly(ADP-ribosyl)ation sensitizes cells against gamma-irradiation and N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine but does not limit DNA replication of a polyomavirus replicon. *Mol Cell Biol* 15:3154-63.
- Kusumoto R, Dawut L, Marchetti C, Wan Lee J, Vindigni A, Ramsden D, Bohr VA. 2008. Werner protein cooperates with the XRCC4-DNA ligase IV complex in end-processing. *Biochemistry* 47:7548-56.
- Kuzminov A. 1999. Recombinational repair of DNA damage in *Escherichia coli* and bacteriophage lambda. *Microbiol Mol Biol Rev* 63:751-813, table of contents.
- Kyng KJ, May A, Kolvraa S, Bohr VA. 2003. Gene expression profiling in Werner syndrome closely resembles that of normal aging. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:12259-64.
- Labbe A, Turaga RV, Paquet ER, Garand C, Lebel M. Expression profiling of mouse embryonic fibroblasts with a deletion in the helicase domain of the Werner Syndrome gene homologue treated with hydrogen peroxide. *BMC Genomics* 11:127.
- Laine JP, Opresko PL, Indig FE, Harrigan JA, von Kobbe C, Bohr VA. 2003. Werner protein stimulates topoisomerase I DNA relaxation activity. *Cancer Res* 63:7136-46.
- Lambeth JD. 2007. Nox enzymes, ROS, and chronic disease: an example of antagonistic pleiotropy. *Free Radic Biol Med* 43:332-47.
- Laud PR, Multani AS, Bailey SM, Wu L, Ma J, Kingsley C, Lebel M, Pathak S, DePinho RA, Chang S. 2005. Elevated telomere-telomere recombination in WRN-deficient, telomere dysfunctional cells promotes escape from senescence and engagement of the ALT pathway. *Genes Dev* 19:2560-70.
- Lavoie J, Bronsard M, Lebel M, Drouin R. 2003. Mouse telomere analysis using an optimized primed in situ (PRINS) labeling technique. *Chromosoma* 111:438-44.
- Lebel M, Cardiff RD, Leder P. 2001. Tumorigenic effect of nonfunctional p53 or p21 in mice mutant in the Werner syndrome helicase. *Cancer Res* 61:1816-9.
- Lebel M, Lavoie J, Gaudreault I, Bronsard M, Drouin R. 2003. Genetic cooperation between the Werner syndrome protein and poly(ADP-ribose) polymerase-1 in preventing chromatid breaks, complex chromosomal rearrangements, and cancer in mice. *Am J Pathol* 162:1559-69.
- Lebel M, Spillare EA, Harris CC, Leder P. 1999. The Werner syndrome gene product copurifies with the DNA replication complex and interacts with PCNA and topoisomerase I. *J Biol Chem* 274:37795-9.

- Lee JW, Kusumoto R, Doherty KM, Lin GX, Zeng W, Cheng WH, von Kobbe C, Brosh RM, Jr., Hu JS, Bohr VA. 2005. Modulation of Werner syndrome protein function by a single mutation in the conserved RecQ domain. *J Biol Chem* 280:39627-36.
- Leistriz DF, Hanson N, Martin GM, Oshima J. 1993. Werner Syndrome.
- Leppard JB, Dong Z, Mackey ZB, Tomkinson AE. 2003. Physical and functional interaction between DNA ligase IIIalpha and poly(ADP-Ribose) polymerase 1 in DNA single-strand break repair. *Mol Cell Biol* 23:5919-27.
- Levine AJ. 1997. p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell* 88:323-31.
- Li B, Comai L. 2000. Functional interaction between Ku and the werner syndrome protein in DNA end processing. *J Biol Chem* 275:28349-52.
- Lombard DB, Beard C, Johnson B, Marciniak RA, Dausman J, Bronson R, Buhlmann JE, Lipman R, Curry R, Sharpe A, Jaenisch R, Guarente L. 2000. Mutations in the WRN gene in mice accelerate mortality in a p53-null background. *Mol Cell Biol* 20:3286-91.
- Marciniak RA, Lombard DB, Johnson FB, Guarente L. 1998. Nucleolar localization of the Werner syndrome protein in human cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:6887-92.
- Martin GM, Sprague CA, Epstein CJ. 1970. Replicative life-span of cultivated human cells. Effects of donor's age, tissue, and genotype. *Lab Invest* 23:86-92.
- Massip L, Garand C, Paquet ER, Cogger VC, O'Reilly JN, Tworek L, Hatherell A, Taylor CG, Thorin E, Zahradka P, Le Couteur DG, Lebel M. Vitamin C restores healthy aging in a mouse model for Werner syndrome. *FASEB J* 24:158-72.
- Matsumoto T, Shimamoto A, Goto M, Furuichi Y. 1997. Impaired nuclear localization of defective DNA helicases in Werner's syndrome. *Nat Genet* 16:335-6.
- Menissier de Murcia J, Ricoul M, Tartier L, Niedergang C, Huber A, Dantzer F, Schreiber V, Ame JC, Dierich A, LeMeur M, Sabatier L, Chambon P, de Murcia G. 2003. Functional interaction between PARP-1 and PARP-2 in chromosome stability and embryonic development in mouse. *EMBO J* 22:2255-63.
- Merrill BJ, Holm C. 1998. The RAD52 recombinational repair pathway is essential in pol30 (PCNA) mutants that accumulate small single-stranded DNA fragments during DNA synthesis. *Genetics* 148:611-24.
- Michel B. 2000. Replication fork arrest and DNA recombination. *Trends Biochem Sci* 25:173-8.
- Misteli T, Soutoglou E. 2009. The emerging role of nuclear architecture in DNA repair and genome maintenance. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10:243-54.

- Miura Y, Endo T. Survival responses to oxidative stress and aging. *Geriatr Gerontol Int* 10 Suppl 1:S1-9.
- Mohaghegh P, Hickson ID. 2001. DNA helicase deficiencies associated with cancer predisposition and premature ageing disorders. *Hum Mol Genet* 10:741-6.
- Monti M, Orru S, Pagnozzi D, Pucci P. 2005. Interaction proteomics. *Biosci Rep* 25:45-56.
- Moser MJ, Oshima J, Monnat RJ, Jr. 1999. WRN mutations in Werner syndrome. *Hum Mutat* 13:271-9.
- Nesvizhskii AI, Keller A, Kolker E, Aebersold R. 2003. A statistical model for identifying proteins by tandem mass spectrometry. *Anal Chem* 75:4646-58.
- Newman JP, Banerjee B, Fang W, Poonepalli A, Balakrishnan L, Low GK, Bhattacharjee RN, Akira S, Jayapal M, Melendez AJ, Baskar R, Lee HW, Hande MP. 2008. Short dysfunctional telomeres impair the repair of arsenite-induced oxidative damage in mouse cells. *J Cell Physiol* 214:796-809.
- Oppenheimer BS, Kugel VH. 1934. Werner's syndrome: A heredofamilial disorder with scleroderma, bilateral juvenil cataract, precocious graying of hair and endocrine stigmatization. *Trans Ass Amer Physicians* 49:358-70.
- Oppenheimer BS, Kugel VH. 1941. Werner's Syndrome, report of the first necropsy and a findings in a new case *Am J Med Sci* 202:629-642.
- Opresko PL. 2008. Telomere ResQue and preservation--roles for the Werner syndrome protein and other RecQ helicases. *Mech Ageing Dev* 129:79-90.
- Opresko PL, Cheng WH, von Kobbe C, Harrigan JA, Bohr VA. 2003. Werner syndrome and the function of the Werner protein; what they can teach us about the molecular aging process. *Carcinogenesis* 24:791-802.
- Opresko PL, Laine JP, Brosh RM, Jr., Seidman MM, Bohr VA. 2001. Coordinate action of the helicase and 3' to 5' exonuclease of Werner syndrome protein. *J Biol Chem* 276:44677-87.
- Opresko PL, Mason PA, Podell ER, Lei M, Hickson ID, Cech TR, Bohr VA. 2005. POT1 stimulates RecQ helicases WRN and BLM to unwind telomeric DNA substrates. *J Biol Chem* 280:32069-80.
- Opresko PL, Otterlei M, Graakjaer J, Bruheim P, Dawut L, Kolvraa S, May A, Seidman MM, Bohr VA. 2004. The Werner syndrome helicase and exonuclease cooperate to resolve telomeric D loops in a manner regulated by TRF1 and TRF2. *Mol Cell* 14:763-74.
- Opresko PL, von Kobbe C, Laine JP, Harrigan J, Hickson ID, Bohr VA. 2002. Telomere-binding protein TRF2 binds to and stimulates the Werner and Bloom syndrome helicases. *J Biol Chem* 277:41110-9.

- Orren DK, Brosh RM, Jr., Nehlin JO, Machwe A, Gray MD, Bohr VA. 1999. Enzymatic and DNA binding properties of purified WRN protein: high affinity binding to single-stranded DNA but not to DNA damage induced by 4NQO. *Nucleic Acids Res* 27:3557-66.
- Orren DK, Machwe A, Karmakar P, Piotrowski J, Cooper MP, Bohr VA. 2001. A functional interaction of Ku with Werner exonuclease facilitates digestion of damaged DNA. *Nucleic Acids Res* 29:1926-34.
- Otterlei M, Bruheim P, Ahn B, Bussen W, Karmakar P, Baynton K, Bohr VA. 2006. Werner syndrome protein participates in a complex with RAD51, RAD54, RAD54B and ATR in response to ICL-induced replication arrest. *J Cell Sci* 119:5137-46.
- Ouyang KJ, Woo LL, Ellis NA. 2008. Homologous recombination and maintenance of genome integrity: cancer and aging through the prism of human RecQ helicases. *Mech Ageing Dev* 129:425-40.
- Ozgenic A, Loeb LA. 2005. Current advances in unraveling the function of the Werner syndrome protein. *Mutat Res* 577:237-51.
- Ozgenic A, Loeb LA. 2006. Werner Syndrome, aging and cancer. *Genome Dyn* 1:206-17.
- Pagano G, Zatterale A, Degan P, d'Ischia M, Kelly FJ, Pallardo FV, Calzone R, Castello G, Dunster C, Giudice A, Kilinc Y, Lloret A, Manini P, Masella R, Vuttariello E, Warnau M. 2005. In vivo prooxidant state in Werner syndrome (WS): results from three WS patients and two WS heterozygotes. *Free Radic Res* 39:529-33.
- Paull TT, Gellert M. 1999. Nbs1 potentiates ATP-driven DNA unwinding and endonuclease cleavage by the Mre11/Rad50 complex. *Genes Dev* 13:1276-88.
- Pivonkova H, Sebest P, Pecinka P, Ticha O, Nemcova K, Brazdova M, Jagelska EB, Brazda V, Fojta M. Selective binding of tumor suppressor p53 protein to topologically constrained DNA: Modulation by intercalative drugs. *Biochem Biophys Res Commun* 393:894-9.
- Poot M, Hoehn H, Runger TM, Martin GM. 1992. Impaired S-phase transit of Werner syndrome cells expressed in lymphoblastoid cell lines. *Exp Cell Res* 202:267-73.
- Prince PR, Emond MJ, Monnat RJ, Jr. 2001. Loss of Werner syndrome protein function promotes aberrant mitotic recombination. *Genes Dev* 15:933-8.
- Puranam KL, Blackshear PJ. 1994. Cloning and characterization of RECQL, a potential human homologue of the Escherichia coli DNA helicase RecQ. *J Biol Chem* 269:29838-45.
- Rajesh C, Gruver AM, Basrur V, Pittman DL. 2009. The interaction profile of homologous recombination repair proteins RAD51C, RAD51D and XRCC2 as determined by proteomic analysis. *Proteomics* 9:4071-86.

- Ren L, Emery D, Kaboord B, Chang E, Qoronfleh MW. 2003. Improved immunomatrix methods to detect protein:protein interactions. *J Biochem Biophys Methods* 57:143-57.
- Revenkova E, Focarelli ML, Susani L, Paulis M, Bassi MT, Mannini L, Frattini A, Delia D, Krantz I, Vezzoni P, Jessberger R, Musio A. 2009. Cornelia de Lange syndrome mutations in SMC1A or SMC3 affect binding to DNA. *Hum Mol Genet* 18:418-27.
- Rodriguez-Lopez AM, Jackson DA, Nehlin JO, Iborra F, Warren AV, Cox LS. 2003. Characterisation of the interaction between WRN, the helicase/exonuclease defective in progeroid Werner's syndrome, and an essential replication factor, PCNA. *Mech Ageing Dev* 124:167-74.
- Rossi ML, Ghosh AK, Bohr VA. Roles of Werner syndrome protein in protection of genome integrity. *DNA Repair (Amst)* 9:331-44.
- Rudolph KL. 1999. Longevity, stress response, and cancer in aging telomerase-deficient mice. *Cell* 96:701-712.
- Saintigny Y, Makienko K, Swanson C, Emond MJ, Monnat RJ, Jr. 2002. Homologous recombination resolution defect in werner syndrome. *Mol Cell Biol* 22:6971-8.
- Sakamoto S, Nishikawa K, Heo SJ, Goto M, Furuichi Y, Shimamoto A. 2001. Werner helicase relocates into nuclear foci in response to DNA damaging agents and co-localizes with RPA and Rad51. *Genes Cells* 6:421-30.
- Salk D. 1982. Werner's syndrome: a review of recent research with an analysis of connective tissue metabolism, growth control of cultured cells, and chromosomal aberrations. *Hum Genet* 62:1-5.
- Salk D, Au K, Hoehn H, Martin GM. 1981. Cytogenetics of Werner's Syndrome cultures skin fibroblasts: variegated translocation mosaicism. *Cytogenet Cell Genet* 30:92-107.
- Salk D, Bryant E, Hoehn H, Johnston P, Martin GM. 1985. Growth characteristics of Werner syndrome cells in vitro. *Adv Exp Med Biol* 190:305-11.
- Sallmyr A, Tomkinson AE, Rassool FV. 2008. Up-regulation of WRN and DNA ligase IIIalpha in chronic myeloid leukemia: consequences for the repair of DNA double-strand breaks. *Blood* 112:1413-23.
- Satoh M, Ishikawa Y, Takahashi Y, Itoh T, Minami Y, Nakamura M. 2008. Association between oxidative DNA damage and telomere shortening in circulating endothelial progenitor cells obtained from metabolic syndrome patients with coronary artery disease. *Atherosclerosis* 198:347-53.
- Saydam N, Kanagaraj R, Dietschy T, Garcia PL, Pena-Diaz J, Shevelev I, Stagljar I, Janscak P. 2007. Physical and functional interactions between Werner syndrome helicase and mismatch-repair initiation factors. *Nucleic Acids Res* 35:5706-16.

- Scappaticci S, Forabosco A, Borroni G, Orecchia G, Fraccaro M. 1990. Clonal structural chromosomal rearrangements in lymphocytes of four patients with Werner's syndrome. *Ann Genet* 33:5-8.
- Schafer T, Maco B, Petfalski E, Tollervy D, Bottcher B, Aebi U, Hurt E. 2006. Hrr25-dependent phosphorylation state regulates organization of the pre-40S subunit. *Nature* 441:651-5.
- Schonberg S, Niermeijer MF, Bootsma D, Henderson E, German J. 1984. Werner's syndrome: proliferation in vitro of clones of cells bearing chromosome translocations. *Am J Hum Genet* 36:387-97.
- Schulz VP, Zakian VA, Ogburn CE, McKay J, Jarzebowicz AA, Edland SD, Martin GM. 1996. Accelerated loss of telomeric repeats may not explain accelerated replicative decline of Werner syndrome cells. *Hum Genet* 97:750-4.
- Scully R, Chen J, Plug A, Xiao Y, Weaver D, Feunteun J, Ashley T, Livingston DM. 1997. Association of BRCA1 with Rad51 in mitotic and meiotic cells. *Cell* 88:265-75.
- Seki M, Miyazawa H, Tada S, Yanagisawa J, Yamaoka T, Hoshino S, Ozawa K, Eki T, Nogami M, Okumura K, et al. 1994. Molecular cloning of cDNA encoding human DNA helicase Q1 which has homology to Escherichia coli Rec Q helicase and localization of the gene at chromosome 12p12. *Nucleic Acids Res* 22:4566-73.
- Sharma A, Awasthi S, Harrod CK, Matlock EF, Khan S, Xu L, Chan S, Yang H, Thammavaram CK, Rasor RA, Burns DK, Skiest DJ, Van Lint C, Girard AM, McGee M, Monnat RJ, Jr., Harrod R. 2007. The Werner syndrome helicase is a cofactor for HIV-1 long terminal repeat transactivation and retroviral replication. *J Biol Chem* 282:12048-57.
- Sharma S, Otterlei M, Sommers JA, Driscoll HC, Dianov GL, Kao HI, Bambara RA, Brosh RM, Jr. 2004. WRN helicase and FEN-1 form a complex upon replication arrest and together process branchmigrating DNA structures associated with the replication fork. *Mol Biol Cell* 15:734-50.
- Sharma S, Sommers JA, Driscoll HC, Uzdilla L, Wilson TM, Brosh RM, Jr. 2003. The exonucleolytic and endonucleolytic cleavage activities of human exonuclease 1 are stimulated by an interaction with the carboxyl-terminal region of the Werner syndrome protein. *J Biol Chem* 278:23487-96.
- Shen JC, Gray MD, Oshima J, Loeb LA. 1998. Characterization of Werner syndrome protein DNA helicase activity: directionality, substrate dependence and stimulation by replication protein A. *Nucleic Acids Res* 26:2879-85.
- Shiraki M, Aoki C, Goto M. 1998. Bone and calcium metabolism in Werner's syndrome. *Endocr J* 45:505-12.
- Singh DK, Ahn B, Bohr VA. 2009. Roles of RECQ helicases in recombination based DNA repair, genomic stability and aging. *Biogerontology* 10:235-52.

- Smith GC, Jackson SP. 1999. The DNA-dependent protein kinase. *Genes Dev* 13:916-34.
- Sobol RW, Horton JK, Kuhn R, Gu H, Singhal RK, Prasad R, Rajewsky K, Wilson SH. 1996. Requirement of mammalian DNA polymerase-beta in base-excision repair. *Nature* 379:183-6.
- Sowd G, Lei M, Opreko PL. 2008. Mechanism and substrate specificity of telomeric protein POT1 stimulation of the Werner syndrome helicase. *Nucleic Acids Res* 36:4242-56.
- Spillare EA, Robles AI, Wang XW, Shen JC, Yu CE, Schellenberg GD, Harris CC. 1999. p53-mediated apoptosis is attenuated in Werner syndrome cells. *Genes Dev* 13:1355-60.
- Squier TC. 2001. Oxidative stress and protein aggregation during biological aging. *Exp Gerontol* 36:1539-50.
- Stivers JT, Jiang YL. 2003. A mechanistic perspective on the chemistry of DNA repair glycosylases. *Chem Rev* 103:2729-59.
- Strachan T. 2005. Cornelia de Lange Syndrome and the link between chromosomal function, DNA repair and developmental gene regulation. *Curr Opin Genet Dev* 15:258-64.
- Stuck AE, Walthert JM, Nikolaus T, Bula CJ, Hohmann C, Beck JC. 1999. Risk factors for functional status decline in community-living elderly people: a systematic literature review. *Soc Sci Med* 48:445-69.
- Sumi SM. 1985. Neuropathology of the Werner syndrome. *Adv Exp Med Biol* 190:215-8.
- Surtees JA, Alani E. 2006. Mismatch repair factor MSH2-MSH3 binds and alters the conformation of branched DNA structures predicted to form during genetic recombination. *J Mol Biol* 360:523-36.
- Suzuki N, Shimamoto A, Imamura O, Kuromitsu J, Kitao S, Goto M, Furuichi Y. 1997. DNA helicase activity in Werner's syndrome gene product synthesized in a baculovirus system. *Nucleic Acids Res* 25:2973-8.
- Suzuki N, Shiratori M, Goto M, Furuichi Y. 1999. Werner syndrome helicase contains a 5'->3' exonuclease activity that digests DNA and RNA strands in DNA/DNA and RNA/DNA duplexes dependent on unwinding. *Nucleic Acids Res* 27:2361-8.
- Szekely AM, Chen YH, Zhang C, Oshima J, Weissman SM. 2000. Werner protein recruits DNA polymerase delta to the nucleolus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:11365-70.
- Tahara H, Tokutake Y, Maeda S, Kataoka H, Watanabe T, Satoh M, Matsumoto T, Sugawara M, Ide T, Goto M, Furuichi Y, Sugimoto M. 1997. Abnormal telomere dynamics of B-lymphoblastoid cell strains from Werner's syndrome patients transformed by Epstein-Barr virus. *Oncogene* 15:1911-20.

- Thannhauser SJ. 1945. Werner's syndrome (progeria of the adult) and Rothmund's syndrome: Two types of closely related hereditary atrophic dermatosis with juvenile cataracts and endocrine features; a critical study of five new cases. *Ann Intern Med* 23:559-626.
- Thompson LH, Schild D. 2002. Recombinational DNA repair and human disease. *Mutat Res* 509:49-78.
- Tonkin ET, Wang TJ, Lisgo S, Bamshad MJ, Strachan T. 2004. NIPBL, encoding a homolog of fungal Scc2-type sister chromatid cohesion proteins and fly Nipped-B, is mutated in Cornelia de Lange syndrome. *Nat Genet* 36:636-41.
- Turaga RV, Massip L, Chavez A, Johnson FB, Lebel M. 2007. Werner syndrome protein prevents DNA breaks upon chromatin structure alteration. *Aging Cell* 6:471-81.
- Turaga RV, Paquet ER, Sild M, Vignard J, Garand C, Johnson FB, Masson JY, Lebel M. 2009. The Werner syndrome protein affects the expression of genes involved in adipogenesis and inflammation in addition to cell cycle and DNA damage responses. *Cell Cycle* 8:2080-92.
- Uhrhammer NA, Lafarge L, Dos Santos L, Domaszewska A, Lange M, Yang Y, Aractingi S, Bessis D, Bignon YJ. 2006. Werner syndrome and mutations of the WRN and LMNA genes in France. *Hum Mutat* 27:718-9.
- von Kobbe C, Harrigan JA, May A, Opresko PL, Dawut L, Cheng WH, Bohr VA. 2003. Central role for the Werner syndrome protein/poly(ADP-ribose) polymerase 1 complex in the poly(ADP-ribosylation) pathway after DNA damage. *Mol Cell Biol* 23:8601-13.
- von Kobbe C, Harrigan JA, Schreiber V, Stiegler P, Piotrowski J, Dawut L, Bohr VA. 2004a. Poly(ADP-ribose) polymerase 1 regulates both the exonuclease and helicase activities of the Werner syndrome protein. *Nucleic Acids Res* 32:4003-14.
- von Kobbe C, Karmakar P, Dawut L, Opresko P, Zeng X, Brosh RM, Jr., Hickson ID, Bohr VA. 2002. Colocalization, physical, and functional interaction between Werner and Bloom syndrome proteins. *J Biol Chem* 277:22035-44.
- Von Kobbe C, May A, Grandori C, Bohr VA. 2004b. Werner syndrome cells escape hydrogen peroxide-induced cell proliferation arrest. *FASEB J* 18:1970-2.
- Wai LK. 2004. Telomeres, telomerase, and tumorigenesis--a review. *MedGenMed* 6:19.
- Wan F, Anderson DE, Barnitz RA, Snow A, Bidere N, Zheng L, Hegde V, Lam LT, Staudt LM, Levens D, Deutsch WA, Lenardo MJ. 2007. Ribosomal protein S3: a KH domain subunit in NF-kappaB complexes that mediates selective gene regulation. *Cell* 131:927-39.
- Watanabe A, Ikejima M, Suzuki N, Shimada T. 1996. Genomic organization and expression of the human MSH3 gene. *Genomics* 31:311-8.

- Werner O. 1904. On cataract in conjunction with scleroderma. Kiel University, Kiel.
- Wold MS. 1997. Replication protein A: a heterotrimeric, single-stranded DNA-binding protein required for eukaryotic DNA metabolism. *Annu Rev Biochem* 66:61-92.
- Wu L, Multani AS, He H, Cosme-Blanco W, Deng Y, Deng JM, Bachilo O, Pathak S, Tahara H, Bailey SM, Behringer RR, Chang S. 2006. Pot1 deficiency initiates DNA damage checkpoint activation and aberrant homologous recombination at telomeres. *Cell* 126:49-62.
- Wykoff DD, O'Shea EK. 2005. Identification of sumoylated proteins by systematic immunoprecipitation of the budding yeast proteome. *Mol Cell Proteomics* 4:73-83.
- Yadavilli S, Hegde V, Deutsch WA. 2007. Translocation of human ribosomal protein S3 to sites of DNA damage is dependant on ERK-mediated phosphorylation following genotoxic stress. *DNA Repair (Amst)* 6:1453-62.
- Yamabe Y, Shimamoto A, Goto M, Yokota J, Sugawara M, Furuichi Y. 1998. Sp1-mediated transcription of the Werner helicase gene is modulated by Rb and p53. *Mol Cell Biol* 18:6191-200.
- Yannone SM, Roy S, Chan DW, Murphy MB, Huang S, Campisi J, Chen DJ. 2001. Werner syndrome protein is regulated and phosphorylated by DNA-dependent protein kinase. *J Biol Chem* 276:38242-8.
- Yazdi PT, Wang Y, Zhao S, Patel N, Lee EY, Qin J. 2002. SMC1 is a downstream effector in the ATM/NBS1 branch of the human S-phase checkpoint. *Genes Dev* 16:571-82.
- Yu CE, Oshima J, Fu YH, Wijsman EM, Hisama F, Alisch R, Matthews S, Nakura J, Miki T, Ouais S, Martin GM, Mulligan J, Schellenberg GD. 1996. Positional cloning of the Werner's syndrome gene. *Science* 272:258-62.
- Zhong Q, Chen CF, Li S, Chen Y, Wang CC, Xiao J, Chen PL, Sharp ZD, Lee WH. 1999. Association of BRCA1 with the hRad50-hMre11-p95 complex and the DNA damage response. *Science* 285:747-50.