

Université de Montréal

Caractérisation biochimique du complexe Smc5-6

par

Marc-André Roy

Faculté de Médecine, Programme de Biologie Moléculaire

Thèse présentée à la Faculté de Médecine en vue de
l'obtention du grade de doctorat en Biologie Moléculaire
option Biologie des systèmes

Novembre 2014

© Marc-André Roy 2014

Résumé

Les membres de la famille SMC (Structural Maintenance of Chromosomes), présents dans tous les domaines de la vie, sont impliqués dans des processus allant de la cohésion des chromatides-sœurs jusqu'à la réparation de l'ADN. Chacun des membres de cette famille, composée de 6 membres (Smc1 à Smc6), s'associe avec un autre membre ainsi qu'à des sous-unités non-SMC pour former 3 complexes : cohésine, condensine et Smc5-6. L'implication du complexe Smc5-6 dans plusieurs aspects du maintien de l'intégrité génomique est bien démontrée. Néanmoins, une question fondamentale concernant ce complexe demeure encore sans réponse: comment peut-il être impliqué dans autant d'aspects de la vie d'une cellule? Encore à ce jour, il est difficile de répondre à cette question en raison du manque d'information disponible au sujet des activités biochimiques de ce complexe. C'est pourquoi l'objectif de ce travail consiste en la caractérisation biochimique du complexe Smc5-6.

La biochimie de cohésine et condensine suggère diverses possibilités en ce qui a trait aux activités biochimiques du complexe Smc5-6. La première étape de mon projet fut donc d'élaborer une procédure pour la purification de Smc5 et Smc6 après surexpression en levure. Après plusieurs expériences, il apparut clair que les deux protéines possèdent une activité de liaison à l'ADN simple brin (ADNs_b) ainsi qu'à l'ADN double brins (ADNd_b) et que, même si les protéines peuvent se lier aux deux types d'ADN, elles possèdent une plus grande affinité pour l'ADNs_b. De plus, ces expériences permirent de démontrer que l'interaction entre Smc5 ou Smc6 et l'ADNs_b est très stable, alors que l'interaction avec

l'ADNdb ne l'est pas. Suite à l'obtention de ces résultats, la seconde étape fut la détermination de la ou des partie(s) de Smc5 et Smc6 permettant la liaison à l'ADN. Pour répondre à cette question, une dissection moléculaire fut réalisée, suivi d'une caractérisation des différents domaines constituants Smc5 et Smc6. De cette façon, il fut possible de démontrer qu'il existe deux sites de liaison à l'ADN sur Smc5 et Smc6 ; le premier site se trouvant dans le domaine «hinge» ainsi que dans la région adjacente du domaine «coiled-coil» et le second au niveau de la tête ATPase des deux protéines. Bien que les deux domaines puissent lier l'ADNsb, il fut démontré qu'une différence majeure existe au niveau de leur affinité pour ce type d'ADN. En effet, le domaine «hinge» possède une affinité plus forte pour l'ADNsb que la tête ATPase. De plus, cette dernière est incapable de lier l'ADNdb alors que le domaine «hinge» le peut.

L'identification des sites de liaison à l'ADN sur Smc5 et Smc6 permettra de créer de nouveaux mutants possédant un défaut dans la liaison à l'ADN. Ainsi, l'étude du complexe Smc5-6 durant la réparation de l'ADN *in vivo* sera facilité.

Mots clés :

«Structural maintenance of chromosomes», Intégrité génomique, Bris double brins de l'ADN, Réparation par homologie de séquence, Smc5-6, Liaison à l'ADN

Abstract

The Smc5-6 complex is part of the SMC (Structural Maintenance of Chromosomes) family and is involved in the maintenance of genome integrity. This complex is required for the replication and repair of DNA. Unfortunately, the DNA substrates recognized by the Smc5-6 complex are still unknown. To address this gap, I used a biochemical approach to purify and functionally characterize the core of the Smc5-6 complex represented by the two SMC proteins. Subsequently, I wanted to understand which part(s) of Smc5 or Smc6 mediate their binding to DNA.

I show here that Smc5 and Smc6 bind to all types of DNA tested. Despite this ability to associate with several types of nucleic acids, they have a clear preference for single-stranded DNA (ssDNA). The ability of Smc5 and Smc6 to link DNA independently of each other suggests that both SMC proteins have the potential to target the Smc5-6 complex to its DNA substrates *in vivo*. Furthermore, the minimal length of ssDNA required for the binding of Smc5 or Smc6 is between 45 to 75 nucleotides. This length of ssDNA is shorter than the size of ssDNA intermediates created during DNA repair or replication reactions. In addition to having a preference for ssDNA, the binding of both SMC proteins to this type of DNA is stronger than their binding to double-stranded DNA (dsDNA). Finally, the molecular dissection of SMC proteins into functional domains revealed that there are two independent DNA-binding sites on each molecule of Smc5 or Smc6. The first region is located in the hinge domain, while the second region is located in the ATPase head of the protein. The affinity and selectivity of independent domains towards DNA substrates

suggest a functional differentiation between the two DNA-binding sites of SMC molecules. Indeed, the hinge domain has a greater affinity for ssDNA than the ATPase head. In terms of selectivity, the hinge domain is capable of binding to dsDNA whereas the ATPase head cannot.

Taken together, our identification of the DNA-binding domains on Smc5 and Smc6 will enable the creation of new mutants with a defect in their DNA-binding activity. Thus, the study of the Smc5-6 complex during DNA repair, *in vivo*, will be facilitated.

Keywords :

Structural maintenance of chromosomes, Genomic stability, DNA double-strand break, Homologous recombination, Smc5-6, DNA-binding

Table des matières

Résumé	ii
Abstract	iv
Table des matières	vi
Liste des tableaux	viii
Liste des figures.....	ix
Liste des abréviations.....	xi
Remerciements.....	xiv
1.0) Introduction	1
1.1) Structure des protéines SMC	5
1.1.1) Structure du «hinge»	6
1.1.2) Structure de la tête ATPase.....	8
1.2) Activités biochimiques des protéines SMC	13
1.2.1) Activités des protéines SMC bactériennes	13
1.2.1.1) MukB	14
1.2.1.2) BsSMC	16
1.2.2) Activités des protéines SMC eucaryotiques.....	19
1.2.2.1) Cohésine	19
1.2.2.2) Condensine.....	23
1.3) Le complexe Smc5-6	25
1.3.1) Architecture et biochimie du complexe Smc5-6	26
1.3.1.1) Implication des membres du complexe Smc5-6 dans le cancer.....	33
1.3.2) Localisation du complexe Smc5-6.....	34
1.3.2.1) Structure et modifications post-traductionnelles de la chromatine ...	34
1.3.2.2) Le cycle cellulaire et la liaison à l'ADN du complexe Smc5-6.....	37
1.3.2.3) Impact du complexe de chargement Scc2-Scc4.....	38
1.3.3) Fonctions biologiques du complexe Smc5-6.....	40
1.3.3.1) La réparation d'un bris double brins	43
1.3.3.2) Le complexe Smc5-6 et la réparation d'un DSB	48
1.3.3.3) Le complexe Smc5-6 et les fourches de réPLICATION effondrées.....	50
1.3.3.4) Homéostasie du rDNA et des télomères.....	54
1.4) Hypothèses et objectifs de la thèse	58
2.0) Caractérisation de l'interaction entre Smc5 et l'ADN.....	61
2.1) Abstract	63
2.2) Introduction.....	64
2.3) Materials and Methods	67
2.4) Results.....	72
2.5) Discussion.....	82
2.6) Acknowledgements.....	86
2.7) References	87
2.8) Figures	91

2.9) Supplementary figures	103
3.0) Caractérisation de l'interaction entre Smc6 et l'ADN.....	105
3.1) Abstract.....	107
3.2) Introduction.....	108
3.3) Materials and Methods	110
3.4) Results.....	111
3.5) Discussion.....	117
3.6) Acknowledgements.....	120
3.7) References	121
3.8) Figures	123
4.0) Effet de la dimérisation sur la liaison à l'ADN de Smc5 et Smc6.....	128
4.1) Abstract	130
4.2) Introduction.....	131
4.3) Materials and Methods	134
4.4) Results.....	140
4.5) Discussion.....	151
4.6) Acknowledgements.....	157
4.7) References	158
4.8) Figures	162
4.9) Table	175
5.0) Discussion	176
5.1) Comparaison entre cohésine, condensine et Smc5-6.....	177
5.2) Interaction entre l'ADNdb et le complexe Smc5-6.....	181
5.3) Interaction entre l'ADNsb et le complexe Smc5-6.....	183
5.4) Impact du dimère Nse5-6 sur l'ouverture du «hinge» de Smc5-6.....	186
5.5) Conclusion.....	189
6.0) Bibliographie.....	190
7.0) Curriculum vitae	217

Liste des tableaux

Chapitre 1.0)

Tableau I) Substrats connus de Nse2 29

Chapitre 4.0)

Tableau I) Plasmids used in this study 175

Liste des figures

Chapitre 1.0)

Figure 1.1) Représentation schématique des complexes SMC.....	4
Figure 1.2) Représentation schématique d'une protéine SMC.....	6
Figure 1.3) Représentation schématique du domaine «hinge» du complexe Smc5-6	7
Figure 1.4) Représentation schématique des têtes ATPase du complexe Smc5-6.....	10
Figure 1.5) Alignement de séquences têtes ATPase Smc5 et Smc6	12
Figure 1.6) Réaction de super enroulement de l'ADN	15
Figure 1.7) Réaction d'hybridation de brin d'ADN	18
Figure 1.8) Réaction de ligation de fragment d'ADN	22
Figure 1.9) Le complexe Smc5-6 chez <i>S. cerevisiae</i> , <i>S. pombe</i> et l'humain	26
Figure 1.10) Vue d'ensemble des fonctions du complexe Smc5-6	42
Figure 1.11) Vue d'ensemble de la réparation par homologie de séquence.....	43
Figure 1.12) Le complexe Smc5-6 et la réparation par homologie de séquence.....	48
Figure 1.13) Mécanismes de contournement d'une lésion lors de la réPLICATION	51
Figure 1.14) Le complexe Smc5-6 et le changement de gabarit.....	52
Figure 1.15) Organisation de l'ADN ribosomale (rDNA)	54
Figure 1.16) Le complexe Smc5-6 et la réparation par homologie de séquence au rDNA	57
Figure 1.17) Liaison à l'ADN de façon topologique.....	60

Les figures 1.1, 1.2, 1.3 et 1.9 ont été reproduites et modifiées avec la permission de l'auteur, soit Damien D'Amours Ph.D.

Chapitre 2.0)

Figure 1) Purification of budding yeast Smc5	91
Figure 2) Sedimentation velocity analysis of Smc5.....	93
Figure 3) DNA-binding specificity and affinity of Smc5	94
Figure 4) Strength of the interaction between Smc5 and DNA	96
Figure 5) Effect of ATP on Smc5 DNA-binding properties.....	99
Figure 6) Binding of Smc5 to short DNA oligonucleotides	101
Supplementary Figure 1) Phenotype of ATPase mutants	103

Chapitre 3.0)

Figure 1) Purification of yeast Smc6	123
Figure 2) Characterization of the DNA-binding properties of yeast Smc6	124
Figure 3) Smc6 binding to ssDNA occurs at physiological concentrations of salts.....	126
Figure 4) Modulation of Smc6 properties by nucleoside di and triphosphates.....	127

Chapitre 4.0)

Figure 1) Purification and DNA-binding activity of Smc5-6 heterodimers.....	162
Figure 2) Comparative analysis of the DNA-binding activity of Smc5-6 heterodimer variants	164
Figure 3) Binding of Smc5-6 heterodimers to structured DNA molecules.....	166
Figure 4) DNA-binding properties of Smc5 monomeric variants	167
Figure 5) Smc5 ATPase head domain purification and DNA-binding activity	169
Figure 6) Smc6 fragment purification and DNA-binding activity	170
Figure 7) The DNA-binding activity of Smc6 head domain is modulated by ATP hydrolysis	173

Chapitre 5.0)

Figure 5.1) Expérience de liaison en présence d'ATPyS	182
Figure 5.2) Représentation schématique du complexe RPA	185
Figure 5.3) Liaison de RPA à l'ADNsB.....	186
Figure 5.4) Implication du dimère Nse5-6 dans la localisation du complexe Smc5-6.....	188

Liste des abréviations

Les abréviations en anglais sont utilisées afin de faciliter la lecture de cette thèse.

- 3D : Tridimensionnelle
ABC : «ATP binding cassette»
ADN : Acide désoxyribonucléique
ADNs (ssDNA) : Acide désoxyribonucléique simple brin
ADNdb (dsDNA) : Acide désoxyribonucléique double brins
ADP : Adénosine diphosphate
ALT : «Alternative lengthening of telomeres»
AMP : Adénosine monophosphate
ATM : «Ataxia telangiectasia mutated»
ATP : Adénosine triphosphate
ATPyS : Adénosine y thiotriphosphate
ATR : «Ataxia telangiectasia mutated and Rad3 related»
bp : Paire de base
BIR : «Break induced replication»
BsSMC : *Bacillus subtilis* SMC
CDK : Protéine kinase dépendante d'une cycline
dHJ : «double-holliday junction»
DSB : Bris double brins
E : Acide glutamique
EMSA : «Electrophoretic mobility shift assay»
FL : «Full length»
G : Glycine
H3K56 : Histone 3 Lysine 56
H3K79 : Histone 3 Lysine 79
HL : «Hinge long»
HM : «Hinge medium»
HR : réparation par homologie de séquence
HS : «hinge short»
HU : Hydroxyurée
IP : Immuno précipitation
IR : Radiation ionisante
K : Lysine
MAGE : «Melanoma antigen gene»
MMS : Méthyle méthane sulfonates
NAD : Nicotinamide adénine dinucléotide
NHEJ : réparation par jonction de brins non homologues
Nse : «Non-SMC elements»
nts : nucléotides
OB fold : «Oligosaccharide/Oligonucleotide binding fold»

P : culot
PCNA : «Proliferating cell nuclear antigen»
PML-NBs : «Promyelocytic leukemia nuclear bodies»
rDNA : ADN ribosomale
RENT : «Regulator of nucleolar silencing and telophase exit»
RFB : Barrière de réplication
RFC : «Replication factor C»
RING : «Really interesting new gene»
S : Surnageant
SCJ : Lien topologique entre chromatides-sœurs
SDSA : «Synthesis dependent strand annealing»
SIR : «Silent information regulator»
SMC : «Structural maintenance of chromosome»
SP-RING : «SIZ/PIAS RING»
SUMO : «Small ubiquitin like modifier»
TLS : «Translesion DNA synthesis»
UV : Radiation ultraviolette

À ma femme et ma famille

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier mon directeur de thèse de m'avoir accueilli dans son laboratoire il y a cinq ans. Son encadrement durant toutes ces années m'a permis de développer une formation scientifique solide qui m'a appris que la planification des expériences et la rigueur durant leur réalisation étaient les mots clés de la réussite scientifique. Cette formation n'aurait pas été complète sans l'enseignement donné sur l'analyse critique de résultats. Ainsi, je profite d'un solide bagage scientifique pour la poursuite de ma carrière. Je tiens aussi à remercier les Drs Alain Verreault et James G Omichinski pour leurs conseils durant mes divers comités de thèse et plus particulièrement, le Dr Alain Verreault pour nos longues discussions sur le complexe Smc5-6, la réparation et la réPLICATION de l'ADN.

J'aimerais aussi remercier les membres anciens comme actuels de mon laboratoire pour leur aide ainsi que leur soutien moral durant toutes ces années. En particulier, Mirela, notre technicienne de laboratoire, pour ses encouragements et les milieux de culture ainsi que Xavier, pour ses précieux conseils d'écriture. Finalement, le travail du personnel de soutien de l'IRIC, sans qui la recherche ne serait pas possible, mérite aussi d'être souligné.

Enfin, je tiens à remercier ma famille, et plus particulièrement ma femme, pour leur soutien constant au cours des années ainsi que leur aide dans la réalisation de mes études.

1.0) Introduction

Dès le 17^e siècle, Robert Hooke déclara que la composition de base de plusieurs organismes était la «cellula». C'est par cette description simpliste que la recherche sur la mitose débuta. Pourtant, pratiquement deux siècles s'écoulèrent entre la description et la visualisation d'une cellule, puisque ce n'est qu'au 19^e siècle que les premières esquisses d'une cellule en division firent leurs apparitions dans une publication de Walter Flemming. De nos jours, les étudiants du secondaire savent déjà ce que sont un chromosome et une cellule en division. Cependant, ils ignorent la complexité des mécanismes que la cellule doit utiliser pour pouvoir transmettre de façon exacte et coordonnée toute son information aux cellules filles.

Pour transmettre son bagage génétique, la cellule doit tout d'abord en faire la réPLICATION avant de la séparer dans chacune de ses cellules filles. Toute l'information à transmettre se présente sous forme d'ADN. Malheureusement, au cours de sa vie, l'ADN d'une cellule souffrira de multiples lésions provenant soit de radiations ionisantes (IR), ultraviolettes (UV) ou encore des produits du métabolisme cellulaire [1]. La cellule doit s'adapter à cette réalité pour survivre tout en conservant la stabilité de son génome [2]. Parmi toutes les lésions subites par la cellule, le bris double brins (DSB) demeure le plus important puisqu'il est létal pour la cellule s'il n'est pas réparé [3]. Il a aussi le potentiel de créer des réarrangements chromosomiques majeurs pouvant induire le cancer à long terme [4]. Cependant, tous les DSBs ne sont pas nocifs, certains peuvent même être bénéfiques pour la santé humaine s'ils sont réparés [5, 6].

Pour pourvoir au maintien de son intégrité génétique, la cellule a élaboré, au cours du temps, divers mécanismes de surveillance appelés points de contrôle du dommage à l'ADN [7, 8]. Ces mécanismes s'assurent de la bonne complétion des phases du cycle cellulaire ainsi que de l'activation contrôlée de la réponse aux dommages à l'ADN lorsque ceux-ci sont détectés [9-11]. L'activation du point de contrôle se résume en un arrêt du cycle cellulaire et une initiation de la réparation de l'ADN. Si les dommages sont trop importants, la sénescence cellulaire ou même l'apoptose peuvent se produire [12]. Tous ces mécanismes agissent de concert pour conserver l'intégrité génomique durant la croissance cellulaire. Néanmoins, il arrive parfois que les mécanismes de progression du cycle cellulaire surpassent l'arrêt dû au point de contrôle, entraînant ainsi la prolifération de cellules comprenant un dommage à l'ADN. Ce type de réponse cellulaire est connu sous le nom d'adaptation [13, 14].

Une famille de gènes essentiels au maintien de l'intégrité génétique répond au nom de «Structural Maintenance of Chromosomes» ou *SMC*. Le premier membre de cette famille (*SMC1*) fut découvert en 1985 lors d'un criblage chez *Saccharomyces cerevisiae* visant la recherche de mutants impliqués dans le maintien génétique d'un mini chromosome artificiel [15]. Depuis cette découverte, plusieurs gènes furent intégrés à la famille *SMC*, qui compte aujourd'hui 6 membres (*SMC1* à *SMC6*) ainsi qu'un cousin éloigné (*RAD50*) [16-19]. Généralement, les protéines *SMC* issues de ces gènes s'associent de façon spécifique à une autre protéine *SMC* pour former trois hétéro dimères. Le vers *C. elegans* fait toutefois exception à cette règle, puisqu'il possède un quatrième complexe [20]. Contrairement aux

eucaryotes, le génome de la plupart des bactéries encode une seule protéine SMC qui forme un homo dimère [21]. Ces dimères possèdent une structure particulière en forme d'arche [22]. Chaque dimère interagit avec des sous-unités régulatrices spécifiques pour former les trois complexes SMC (figure 1.1). Ainsi, l'association de Smc1 et Smc3 forme le noyau du complexe cohésine impliqué dans la cohésion des chromatides-sœurs, alors que l'association de Smc2 et Smc4 compose le cœur du complexe condensine dont la fonction est l'assemblage et la ségrégation des chromosomes [23, 24]. Finalement, Smc5 et Smc6, qui présentent une séquence primaire légèrement différente à celle de Smc1 à Smc4, s'associent pour former l'unité de base du troisième complexe SMC impliquée dans la réparation de l'ADN [25].

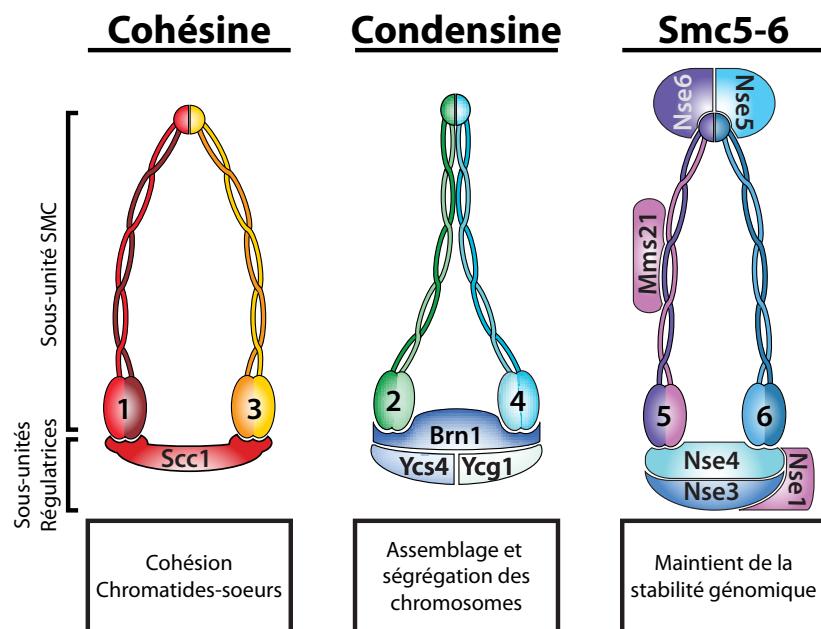


Figure 1.1

Représentation schématique des trois complexes SMC ainsi que leur fonction dans la cellule. Figure reproduite et modifiée avec la permission de l'auteur.

La caractérisation biochimique du complexe Smc5-6 représente une tâche importante et de longue haleine, évoluant sur de nombreuses années. Comme bien des projets de doctorat, le temps ne permet pas l'aboutissement définitif d'une telle recherche. Le procédé demeure dynamique et de nouvelles découvertes surviennent régulièrement. L'objectif de cette thèse se veut donc une introduction sur la caractérisation biochimique de ce complexe d'intérêt. Pour ce faire, la littérature sur les protéines SMC en général sera brièvement revue, suivie d'une description biochimique des protéines SMC bactériennes, de cohésine et de condensine. Une analyse exhaustive de l'architecture, de la biochimie ainsi que des fonctions biologiques du complexe Smc5-6 permettront ensuite d'énoncer les hypothèses de recherche et les questions s'y rapportant. Les travaux de recherche seront présentés sous forme d'articles scientifiques. Finalement, pour conclure, les résultats seront discutés et analysés pour déterminer leur implication dans la compréhension de la fonction du complexe Smc5-6.

1.1) Structure des protéines SMC

La famille des protéines SMC se définit par la structure tridimensionnelle (3D) très particulière de chaque molécule qui la compose. En effet, la forme de ces protéines se rapproche beaucoup plus d'une ellipse que d'une sphère. Leur longueur est d'environ 50nm, soit l'équivalent de 150 paires de bases (bp) d'ADN double brins (ADNdb) [26]. Pourtant, il n'y a pas que leur structure 3D qui soit particulière, l'organisation de leurs domaines l'est aussi [27]. Après leur repliement secondaire, les protéines SMC peuvent être divisées en cinq parties (figure 1.2). Tout d'abord, deux motifs de liaison aux nucléotides, un

«Walker A» et un «Walker B», se retrouvent respectivement en position N-terminale et en C-terminale de la protéine [26, 28]. La partie C-terminale contient aussi un «signature motif» ou motif c [26]. Entre ces motifs se trouvent deux longues hélices α connectées entre elles par un domaine globulaire [26, 28]. Il fut démontré, suite à des expériences de microscopie électronique et biochimiques, que chaque protéine SMC se replie sur elle-même grâce à des interactions antiparallèles entre les deux hélices α [22, 29-31]. Ce repliement permet le rapprochement entre les motifs de liaison aux nucléotides et la création d'une tête ATPase complète à une extrémité de la protéine de même qu'un domaine «hinge» à l'autre extrémité [26, 28]. C'est d'ailleurs ce domaine qui permet une interaction spécifique entre deux protéines SMC [30, 32]. Au centre de la protéine se trouve le domaine «coiled-coil» formé par l'interaction des deux hélices α entre elles.

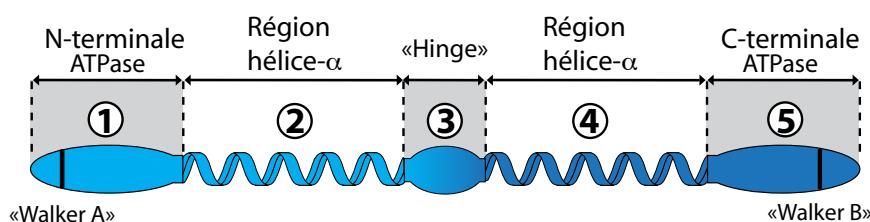


Figure 1.2

Représentation schématique d'une protéine SMC et de ses cinq domaines.
Figure reproduite et modifiée avec la permission de l'auteur.

1.1.1) Structure du «hinge»

Plusieurs structures cristallines du domaine «hinge» des membres de la famille SMC furent résolues au cours des dernières années [27, 29, 33-35]. La première fut élaborée à partir du «hinge» de la bactérie *Thermotoga maritima* [29]. Cette structure, de même que les

subséquentes, permirent de mieux comprendre l'interaction entre deux protéines SMC. Premièrement, l'interaction entre deux domaines «hinge» entraîne la formation d'une structure en forme d'anneau. Cette structure constitue le lien permettant la fermeture de la partie supérieure de l'arche formée lors de l'interaction entre deux protéines SMC (figure 1.3). Chez les procaryotes, cette forme d'anneau possède une double symétrie au niveau structurel [33], ce qui signifie qu'en utilisant deux symétries consécutives, il est possible de retrouver une structure identique à celle de départ. Cette propriété du «hinge» des procaryotes est secondaire à la formation d'un homo dimère. Malheureusement, malgré la conservation de la structure générale en forme d'anneau, cette propriété n'est pas retrouvée chez les eucaryotes en raison de la formation d'un hétéro dimère.

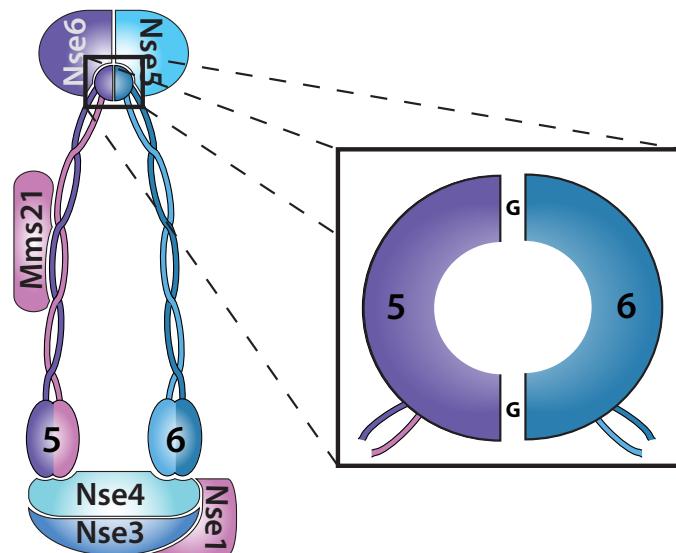


Figure 1.3

Représentation schématique du domaine «hinge» du complexe Smc5-6. Cette représentation est basée sur la structure du «hinge» de cohésine. L'agrandissement du domaine «hinge» (encadré noir) permet la visualisation de certains détails importants. Au centre du domaine «hinge» se trouve une cavité. Les lettres G représentent la glycine conservée qui permet l'interaction entre le «hinge» de Smc5 et celui de Smc6. Figure reproduite et modifiée avec la permission de l'auteur.

Au centre de la structure en forme d'anneau se trouve une cavité. Les parties inférieure et supérieure de cette dernière comprennent les surfaces d'interaction entre les deux domaines «hinge» [27, 33, 36]. Des feuillets β occupent la majorité de la surface d'interaction, le reste étant occupé par deux hélices α [27, 33]. Chez les procaryotes, les résidus importants à l'intérieur de ces structures sont des glycines. Ces dernières sont disposées dans la séquence consensus GGX_3GG où X représente n'importe quel acide aminé [32]. La mutation graduelle de ces résidus provoque des changements dans le coefficient de sédimentation du dimère SMC chez le *Bacillus subtilis* jusqu'à l'obtention d'un monomère lorsque tous les résidus sont mutés [30, 37].

Chez les eucaryotes, les mêmes interactions, principalement composées de feuillets β , sont responsables de l'association entre deux domaines «hinge» [27, 36]. La séquence consensus pour l'ordre des glycines, dans ce cas-ci, est GX_6GX_3GG [32]. Bien que les glycines soient très importantes pour l'interaction entre les deux domaines «hinge», il semble que des interactions hydrophobes soient aussi importantes [38]. Cependant, l'interaction entre Smc5 et Smc6 ne suit pas la règle énoncée ci-dessus pour le moment. En effet, une seule glycine est conservée, permettant l'interaction entre ces deux protéines SMC [39].

1.1.2) Structure de la tête ATPase

Historiquement, l'«ATP binding cassette» ou tête ATPase ABC fut défini comme le site de liaison aux nucléotides des transporteurs de la famille ABC [40]. Ces transporteurs sont membres d'une vaste famille de protéines transmembranaires qui assurent le transport de

solutés variés à travers la membrane cellulaire [41-43]. Avec l'avènement du séquençage de génomes entiers et l'amélioration des outils bioinformatiques, il est maintenant clair que la tête ATPase ABC n'est pas seulement limitée aux transporteurs ABC. En effet, le même type de tête ATPase se retrouve chez les protéines SMC, l'enzyme de réparation des miss-appariements de l'ADN MutS et l'enzyme de réparation par excision de nucléotides UvrA [44].

Tout comme le «hinge», plusieurs structures cristallines des têtes ATPase ABC furent analysées au cours des dernières années [45-49]. Il fut découvert que chaque tête ATPase ABC comprend deux lobes. Le premier lobe contient une hélice α entourée de feuillets β . La partie N-terminale de cette hélice α comprend le site de liaison aux nucléotides formé par le «Walker A» [37, 50]. Une mutation dans ce motif empêche la liaison de l'ATP au site catalytique [37, 50]. Le deuxième lobe est surtout constitué d'hélices α et inclut le motif c. La fonction de ce motif sera discutée plus loin. La délimitation entre les deux lobes est possible grâce aux feuillets β renfermant le «Walker B» (figure 1.4). L'ATP se lie dans le site catalytique formé par le «Walker A» et le «Walker B». Ce dernier a aussi pour fonction l'hydrolyse de l'ATP, puisqu'une mutation à l'intérieur de ce motif augmente le temps de résidence de l'ATP dans le site catalytique en diminuant la vitesse d'hydrolyse [50, 51].

Bien que chaque tête ATPase possède la capacité de lier et hydrolyser l'ATP, seulement une très faible activité ATPase est détectée en utilisant des monomères SMC [52-54]. L'activité ATPase peut être augmentée par l'utilisation de dimères [21, 37, 55]. En

effet, ces dimères possèdent la caractéristique importante de travailler en paire, soit comme homo dimère ou encore comme hétéro dimère [56]. Le motif c, quant à lui, est essentiel au rapprochement entre les deux têtes ATPase puisqu'il fait office de capteur pour détecter la présence d'ATP dans le site catalytique (figure 1.4) [45, 57, 58]. Pour ce faire, le motif c créé des interactions spécifiques avec les atomes d'oxygènes présents sur le phosphate distal (γ) de la molécule d'ATP. L'interaction entre le motif c et le phosphate γ est essentielle pour effectuer le changement de conformation de la tête ATPase qui lui permet de s'emboiter parfaitement avec une autre tête ATPase [45, 58].

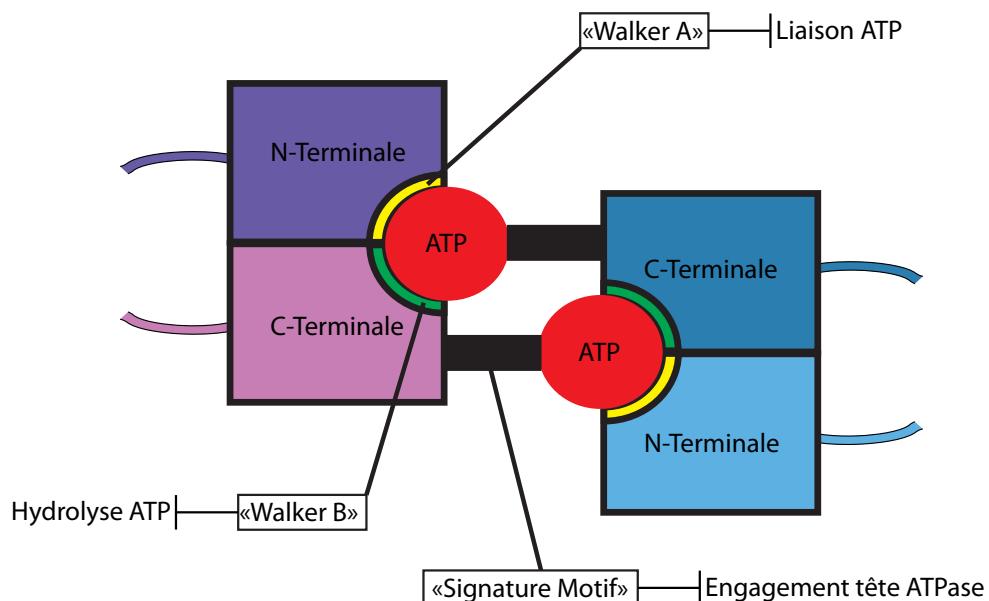


Figure 1.4

Représentation schématique de la tête ATPase de Smc5 et Smc6. Ainsi, chaque tête ATPase peut lier une molécule d'ATP. Cette liaison est faite entre le «Walker A» et le «Walker B». Par la suite, la molécule d'ATP fait un lien avec le «signature motif» de la seconde tête ATPase. Une mutation dans l'un de ces motifs cause un effet différent sur le cycle ATPasique des protéines SMC. Cet effet est écrit à côté de chacun des motifs.

En plus des motifs déjà discutés, la tête ATPase des protéines SMC contient d'autres structures conservées appelées boucles. La première de ces structures, la boucle A, est située à environ 25 acides-aminés en amont du «Walker A» [59, 60]. Cette boucle joue un rôle important dans la liaison et l'hydrolyse de la molécule d'ATP. Elle est caractérisée par la conservation d'un résidu aromatique [59, 60]. À environ 18 acides-aminés en aval du «Walker A» se situe la boucle R [61]. Cette boucle est impliquée dans la stimulation de l'activité ATPase des protéines SMC par l'ADN et se caractérise par la conservation d'un résidu arginine [61]. La mutation de ce résidu en alanine provoque une perte du potentiel de stimulation par l'ADN sans avoir aucun effet sur l'activité basale d'hydrolyse de l'ATP [61]. Cet acide-aminé joue le rôle de capteur au niveau de la détection de l'ADN. La prochaine boucle se situe dans la partie N-terminale de la tête ATPase, près de la jonction entre cette dernière et le domaine «coiled-coil» [45]. La boucle Q est caractérisée par la conservation d'un résidu glutamine servant à coordonner un ion Mg²⁺ lors de l'hydrolyse de la molécule d'ATP [45, 62].

La boucle D, située en aval du «Walker B» dans la partie C-terminale de la tête ATPase, contient un acide aspartique très conservé [45, 62]. Sa fonction est similaire à celle du motif c, soit le rapprochement entre les deux têtes ATPase [63]. La dernière boucle, la boucle H, se trouve après la boucle D [45, 62]. Elle contient un résidu histidine hautement conservé dont la fonction est le positionnement et l'activation d'une molécule d'eau permettant l'attaque nucléophile lors de l'hydrolyse de l'ATP [45, 62]. Afin de bien visualiser l'emplacement des différentes structures (i.e. «Walker A», «Walker B», motif C et les boucles)

sur les têtes ATPase, la représentation d'un alignement de la séquence des têtes ATPase de Smc5 et Smc6 est disponible à la figure 1.5.

Finalement, la protéine SMC du *Pyrococcus furiosus* ainsi que Rad50 possèdent, en plus de leur activité ATPase, une activité adénylate kinase [63-65]. Cette activité permet à la protéine SMC de transformer une molécule d'ATP et d'AMP en deux molécules d'ADP.

Smc5	...GSIIKIRLQDFVTYTLTEFNLSPLSILNMII	GPN GSGKSTFV	-80
Smc6	...GYIKKVLRLNFM CHE HFELELGSRNLNFIV	GNN NGSGKSAIL	-120
	Boucle A		«Walker A»
Smc5	CAVCLGLAGKPEYIG R SKKVEDFIKNGQDVSKIEITLKNSPNV	-123	
Smc6	TAITIGLAGAKASETN R GSSLKDLIREGCYSAKIILHLDNSKYG	-163	
	Boucle R		
Smc5	TDIEYIDARDETIKITRIITRSKRRSDYLIN---	DYQVSESV	-166
Smc6	AYQQGIFG--NEIIVERIIKRDGPASFSLRSENGKEISNKKD	-206	
Smc5	VKTIVAQQLNIQLDNLCQFLSQ E ERVEEFARLKSVKLLVETI...	-209	
Smc6	IQTIVVDYFSVPVSNP <i>M</i> CFLSQDAARSFLTASTSQDKYSHF...	-249	
	Boucle Q		
Smc5	...DNAPLKKLDSHT QSG GERAVSTVLYMIALQEFTSAPFRVV	-1013	
Smc6	...T----KARNVDT LSG GEKSFSQMALLLATWKPMRSRIAL	-1046	
	«Signature Motif»		
Smc5	DE INQGM D SRN E RIVHKAMVENACAE N T S QYFLIT P KLLTGLH	-1056	
Smc6	DEF DVFMD Q VNR I GTT L IVKKL D IART Q TII I T P QDIG---	-1089	
	«Walker B»	Boucle D	Boucle H
Smc5	YHEKMRIHCVMAGSWIPNPSEDPKMIHFGETSNYSFD	-1093	
Smc6	-----KIADIDSSGVSIHRMRDPERQNNSNFYN-----	-1114	

Figure 1.5

Alignement de séquences. La séquence des têtes ATPase de Smc5 et Smc6 furent alignées pour montrer l'emplacement des différentes structures (i.e. «Walker A», «Walker B», «Signature Motif» et les boucles).

1.2) Activités biochimiques des protéines SMC

L'ADN est impliqué dans la fonction de chacun des complexes SMC. Il n'est donc pas étonnant que les activités biochimiques des protéines SMC impliquent toutes l'ADN. Ces activités peuvent être divisées en deux catégories. La première comprend les activités communes aux trois complexes SMC tel que l'hydrolyse de l'ATP et la liaison à l'ADN. La seconde comprend les activités spécifiques à un complexe SMC comme le super-enroulement de l'ADN, la ligation de fragments d'ADN ou encore l'hybridation de brins d'ADN.

1.2.1) Activités des protéines SMC bactériennes

Chez les procaryotes, les protéines SMC les mieux décrites sont celles du *Bacillus subtilis* (BsSMC) et d'*Escherichia coli* (MukB) [66, 67]. Les fonctions des complexes SMC issues de ces deux protéines sont très similaires aux fonctions de condensine [66, 67]. En effet, MukB joue un rôle essentiel dans la ségrégation des chromosomes [68] et interagit avec deux autres protéines, MukE et MukF, qui sont toutes aussi importantes pour la ségrégation des chromosomes [69]. En ce qui concerne la protéine BsSMC, sa délétion mène à la formation de cellules sans noyau ainsi qu'à la décondensation prématuée de l'ADN [70-72]. Pour que ce complexe accomplisse sa fonction, il doit interagir avec deux autres protéines, ScpA et ScpB [73, 74].

1.2.1.1) MukB

Étant membre de la famille des protéines SMC, MukB possède les mêmes motifs de liaison et d'hydrolyse des nucléotides [67]. D'ailleurs, lorsqu'incubée sous forme de dimère, MukB possède une très faible activité d'hydrolyse de l'ATP [75]. Cependant, l'addition des sous-unités régulatrices MukE et MukF au dimère MukB entraîne la stimulation de son activité ATPase [75, 76]. Bien qu'il puisse interagir avec l'ADN, l'activité ATPase de MukB n'est pas stimulée en présence d'ADNdb [75, 76].

MukB joue donc un rôle important dans la biologie des chromosomes. Pour accomplir sa fonction, il doit interagir avec l'ADN ou les protéines de la chromatine bactérienne. Il fut démontré, en 1992, que MukB possède la faculté de lier l'ADNdb [77, 78]. Par la suite, en 2009, une étude détermina le site de liaison principal à l'ADN et les acides aminés impliqués [76]. Ces derniers se situent à la jonction entre la tête ATPase et le domaine «coiled-coil» et forment un canal chargé positivement. La mutation de ces résidus en charge négative aboli complètement, ou très fortement, le potentiel de liaison à l'ADNdb de MukB.

La liaison de MukB à l'ADNdb circulaire provoque son super enroulement [78]. Cette activité permet l'insertion de torsions négatives à l'intérieur d'un fragment d'ADNdb circulaire lorsqu'il est incubé en présence du dimère MukB et de topoisomérase I (figure 1.6A). Si le fragment d'ADNdb contient une entaille simple brin et qu'il subit une incubation en présence du dimère MukB et de topoisomérase II, la formation de nœuds à trois jonctions

se produit (figure 1.6B) [78]. Pour que ce type de nœud prenne forme, le dimère MukB doit organiser l'ADN pour présenter deux boucles avec une configuration droite. Le traitement subséquent avec la topoisomérase II conduit à la formation de nœuds à trois jonctions. L'ajout des sous-unités régulatrices MukE et MukF au dimère MukB abolit la liaison à l'ADN ainsi que le super enroulement ou la formation de nœuds [79].

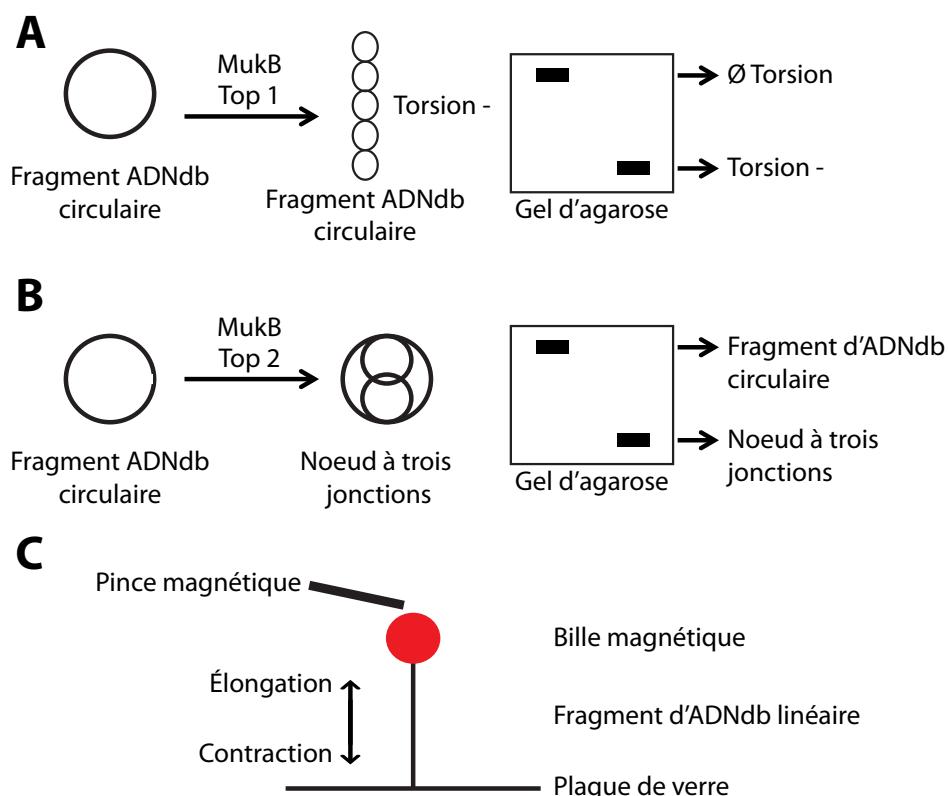


Figure 1.6

A) Représentation graphique de la réaction de super-enroulement de l'ADN par MukB. B) Représentation graphique de la formation de noeuds à trois jonctions par MukB. C) Représentation schématique de l'expérience avec de l'ADNdb fixé à une bille magnétique et à une plaque de verre pour détecter l'élongation ou la contraction de l'ADN.

En plus de permettre le super enroulement de l'ADN et la formation de nœuds à trois jonctions, le dimère MukB provoque la contraction de fragments d'ADNdb linéaires [80]. Ce type d'expérience peut être pratiqué sur un fragment d'ADNdb linéaire attaché à une plaque de verre d'un côté et à une bille magnétique de l'autre (figure 1.6C). Ainsi, il est possible d'exercer une force sur le fragment d'ADNdb à l'aide d'une pince magnétique. L'incorporation du dimère MukB crée une contraction du fragment d'ADN. Cette contraction se transmet à la pince magnétique, ce qui permet sa détection. Pour que MukB crée une contraction, une faible force doit être appliquée sur l'ADN, sans être trop importante [80].

1.2.1.2) BsSMC

BsSMC possède une forte activité d'hydrolyse de l'ATP qui peut cependant être réduite par l'addition des sous-unités régulatrices ScpA et ScpB [21, 51]. Néanmoins, l'addition d'ADN simple brin (ADNsb) ou d'ADNdb à la réaction entraîne une stimulation de l'activité ATPase du dimère BsSMC [21]. Bien qu'une stimulation soit provoquée par les deux types d'ADN, l'ADNsb possède le meilleur potentiel de stimulation [21].

Le dimère BsSMC a le potentiel de lier l'ADNsb ainsi que l'ADNdb [21]. Bien que la protéine ait la capacité de lier les deux types d'ADN, elle possède une meilleure affinité pour l'ADNsb [21]. Le site de liaison se trouve au niveau du domaine «hinge», mais pour que la liaison soit possible, une petite partie du domaine «coiled-coil» doit aussi être présente [30]. Il fut démontré, par certains auteurs, que le domaine «hinge» seul était

insuffisant pour promouvoir la liaison à l'ADNs_b. Ainsi, contrairement à MukB, la tête ATPase n'a aucun impact sur l'activité de liaison à l'ADN. De plus, les mêmes auteurs démontrent que la dimérisation de BsSMC est un prérequis pour la liaison à l'ADN. Plus récemment, une étude prouva que les résidus importants pour la liaison à l'ADNs_b se situent sur la surface extérieure du domaine «hinge» et forment un endroit chargé positivement [81]. Conséquemment, la mutation de ces résidus en charge négative peut abolir non seulement la liaison à l'ADNs_b de BsSMC, mais aussi la stimulation de son activité ATPase.

L'ADNs_b permet la visualisation de deux autres activités biochimiques de la protéine BsSMC, soit l'hybridation de brins d'ADNs_b et la formation d'immenses complexes nucléoprotéiques [21]. L'hybridation par les protéines SMC peut être visualisée lorsque la protéine ou le complexe est incubé en présence d'ADN dénaturé par la chaleur (figure 1.7A). Cet ADN se présente sous forme d'ADNs_b complémentaire en solution. Si l'hybridation de brins d'ADN est stimulée par la protéine, un premier morceau d'ADNs_b entre en contact avec un second morceau d'ADNs_b complémentaire pour former de l'ADNb. Pour différencier les deux types d'ADN, une migration sur gel d'agarose s'impose pour séparer les morceaux d'ADN en fonction de leur poids moléculaire. Comme l'ADNb est deux fois plus lourd que l'ADNs_b, ont observe une différence au niveau de leur migration sur un gel d'agarose. La protéine BsSMC possède une autre caractéristique particulière, soit sa capacité à former d'immenses complexes nucléoprotéiques lorsqu'elle est incubée en présence d'ADNs_b et d'ATP [21]. Ces complexes sont spéciaux, car ils

peuvent être précipités par une simple centrifugation à basse vitesse (figure 1.7B).

Pourtant, lorsque la protéine est incubée seule ou en présence d'ADNsb ou d'ATP, ces complexes nucléoprotéiques ne sont pas formés [21].

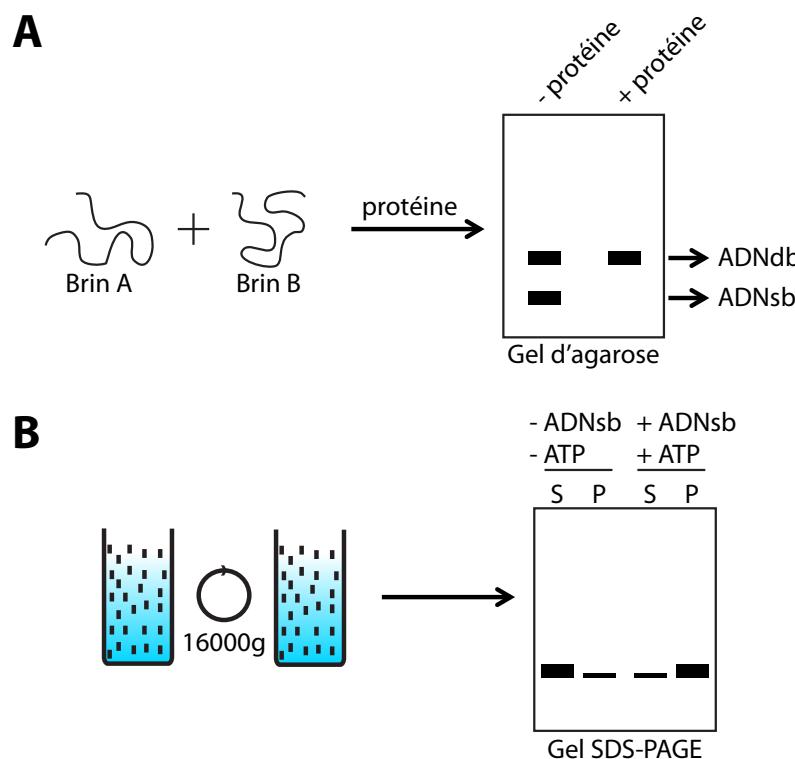


Figure 1.7

A) Représentation schématique de la réaction d'hybridation de brins d'ADN. Après dénaturation par la chaleur, les brins d'ADN complémentaire (A et B) sont incubés avec la protéine SMC pour déterminer si cette dernière peut reconstituer de l'ADNdb. **B)** Représentation schématique de la formation de complexes nucléoprotéique ainsi que de leur séparation par centrifugation. Suite à la centrifugation, il y a détection des protéines par migration sur un gel SDS-PAGE. La lettre S est pour le surnageant alors que la lettre P est pour le culot.

1.2.2) Activités des protéines SMC eucaryotiques

Chez les eucaryotes, les complexes SMC les mieux étudiés sont cohésine (Smc1 et Smc3) et condensine (Smc2 et Smc4). Cohésine est impliquée dans la cohésion des chromatides-sœurs jusqu'à la transition métaphase-anaphase. Pour accomplir cette fonction, cohésine capture les chromatides-sœurs à l'intérieur de l'arche [82]. Lorsque tous les chromosomes sont correctement alignés sur la plaque équatoriale, la sous-unité Scc1 du complexe cohésine est clivée par séparase, ce qui permet la séparation des chromosomes dans deux cellules filles [83]. Condensine, quant à elle, joue un rôle dans l'organisation structurelle et fonctionnelle des chromosomes. Son activité est contrôlée par la phosphorylation des sous-unités régulatrices du complexe [84, 85]. En plus de leur implication dans la biologie des chromosomes, cohésine et condensine jouent aussi un rôle dans la réparation de l'ADN [86-89]. Finalement, le dernier membre de cette famille, le complexe Smc5-6 (Smc5 et Smc6), est moins bien caractérisé. Son implication dans plusieurs voies de réparation de l'ADN est toutefois bien décrite [90]. Comme leurs homologues procaryotes, les protéines SMC eucaryotes prennent part à plusieurs activités biochimiques appartenant à l'une des deux catégories mentionnées ci-haut.

1.2.2.1) Cohésine

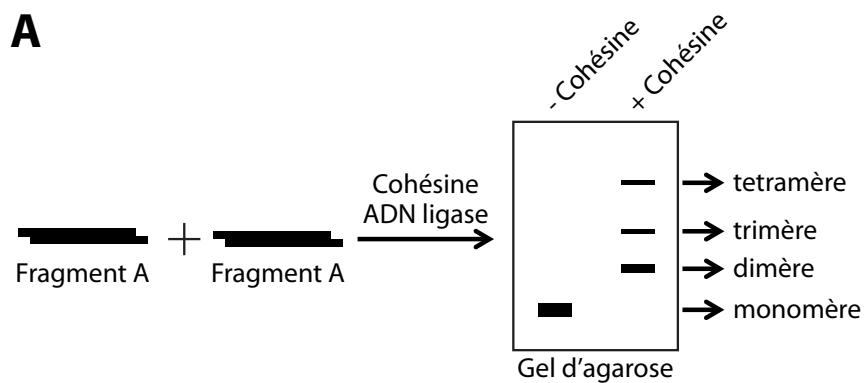
Le cœur du complexe cohésine est formé de deux protéines SMC auxquelles s'ajoutent deux autres sous-unités. La première est connue sous le nom de Scc1 et agit à titre de sous-unité «kleisin» du complexe. Elle permet de refermer l'arche en interagissant avec la tête ATPase de chaque protéine SMC. Ainsi, la partie C-terminale de Scc1 se

connecte à Smc1 et la partie N-terminale avec Smc3 [29, 91]. La deuxième sous-unité (Scc3), quant à elle, s'associe à Scc1, mais sa fonction principale reste encore nébuleuse [92].

L'activité ATPase de cohésine est essentielle à son fonctionnement *in vivo* [50, 93]. Effectivement, la liaison de l'ATP à la tête ATPase de Smc1 est fondamentale à l'association entre Scc1 et l'hétéro dimère Smc1-Smc3 [50]. De plus, la présence de mutations dans le motif c de Smc1 ou Smc3 abolit l'interaction entre cohésine et la chromatine, mais n'a aucun impact sur l'association de Scc1 avec l'hétéro dimère [50]. D'ailleurs, la tête ATPase de Smc1 purifiée avec la partie C-terminale de Scc1 peut former un homo dimère [94]. L'activité ATPase de cet homo dimère est stimulée par la présence d'ADNdb dans la réaction [94]. Malgré la stimulation de son activité ATPase par l'ADNdb, aucune interaction directe n'a été démontrée entre la tête ATPase de Smc1 et l'ADNdb [94]. Bien que la tête ATPase de Smc1 puisse former un homo dimère, la tête ATPase de Smc3 demeure le partenaire préféré d'association. En 2006, une étude démontre que l'addition de la tête ATPase de Smc3 à celle de Smc1 augmente l'activité ATPase comparativement à Smc1 ou Smc3 seul [95]. De plus, l'addition de la partie C-terminale de Scc1 stimule la réaction d'hydrolyse de l'ATP. Pourtant, la partie N-terminale de Scc1 ne semble avoir aucun effet sur cette activité ATPase. En utilisant les deux têtes ATPase, il apparaît que l'ADNdb perd tout effet de stimulation [95]. Finalement, en répétant les mêmes tests, mais en utilisant les protéines SMC pleines longueurs, les mêmes résultats sont observés [95].

La liaison de cohésine à l'ADN fut démontrée de multiples façons. Tout d'abord, dans un extrait d'œuf de grenouille *Xenopus*, la déplétion de cohésine par Immuno-Précipitation (IP) provoque un défaut de cohésion entre les chromatides-sœurs [96]. De plus, cohésine peut être purifiée sous forme de dimère (Smc1-3) ou de trimère avec Scc1. Sous la forme d'un dimère, elle peut se lier à l'ADNdb ainsi que faiblement à une forme d'ADN en croix [97, 98]. Sous la forme d'un trimère, cohésine se lie fortement à l'ADN en forme de croix [98]. À l'époque, ces observations soulevèrent beaucoup d'intérêt au sujet du domaine «hinge» de cohésine, qui comprend le «hinge» de Smc1 et de Smc3. Ainsi, une étude démontre que le «hinge» de cohésine peut se lier à l'ADNdb de même qu'à l'ADN contenant des structures secondaires [32]. Cette même étude prouva que la liaison à l'ADNdb dépend de la présence d'environ 20 acides-aminés faisant la transition entre le domaine «hinge» et le domaine «coiled-coil» et que les monomères obtenus après la mutation des interfaces de dimérisation sont incapables de lier l'ADNdb [32]. Ainsi, la dimérisation des protéines SMC de cohésine semble requise pour la liaison à l'ADN, mais n'est pas suffisante à elle seule. Suite à cette étude, la structure du «hinge» de cohésine fut obtenue par cristallisation [36]. Cette structure permis de démontrer que le pourtour de la cavité au centre du «hinge» est chargé positivement et que la neutralisation de ces charges n'a pas d'effet sur la formation d'un dimère entre le «hinge» de Smc1 et celui de Smc3. Les simples mutants du «hinge» de Smc1 ou de Smc3 n'ont aucun impact sur l'association de cohésine aux chromosomes. Cependant, le double mutant, dont les deux «hinge» (Smc1 et Smc3) sont mutés, est létal [36].

Parmi les activités biochimiques spécifiques à cohésine, il est intéressant de constater qu'elle peut stimuler la ligation de fragments d'ADN (figure 1.8A). L'incubation de cohésine avec des fragments d'ADN provoque un rapprochement entre les fragments d'ADN permettant à une ADN ligase de créer des liens. Ces liens entre les différents fragments d'ADN conduisent à la formation de dimères, de trimères et même de tétramères d'ADN [97]. Lorsque cohésine est incubée avec des fragments d'ADN circulaires et la topoisomérase II, un «catenate» se forme (figure 1.8B). La formation d'un «catenate» survient lorsqu'un fragment d'ADN circulaire est retenu à un autre fragment d'ADN circulaire par des liens fermés [97]. Finalement, le dimère Smc1-3 provoque la contraction de l'ADNdb, qui peut être observée en utilisant la technique des pinces magnétiques (figure 1.6C) [99].



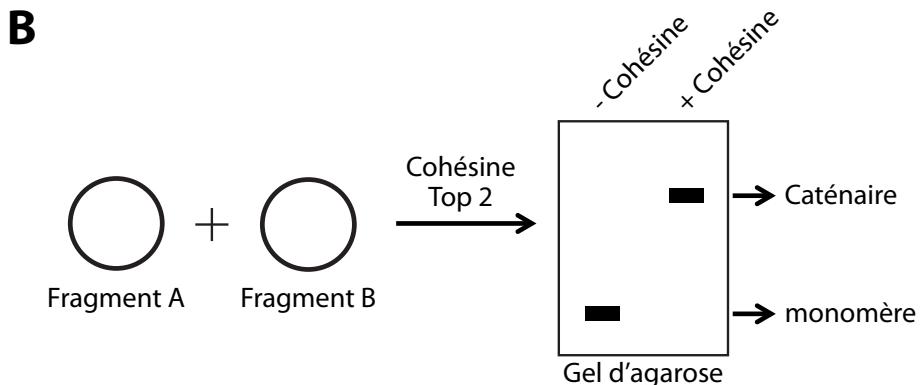


Figure 1.8

A) Représentation schématique de la réaction de ligation. Cohésine est incubée avec des fragments d'ADNdb dont les extrémités sont cohésives. L'addition de l'ADN ligase va permettre la ligation de ces fragments. Pour visualiser la réaction de ligation, il suffit de faire migrer les produits sur un gel d'agarose. **B)** Représentation schématique de la formation de «catenate». Ainsi, cohésine est incubée avec des fragments d'ADNdb circulaire et la topoisomérase II. Après réaction, il y a migration des produits sur gel d'agarose.

1.2.2.2) Condensine

Le noyau de condensine est constitué de deux protéines SMC auxquelles s'ajoutent trois autres sous-unités. La première de ces sous-unités, Brn1, représente la sous-unité «kleisin» du complexe condensine et est responsable de la fermeture de l'arche; la partie N-terminale interagit avec Smc2 alors que la partie C-terminale interagit avec Smc4 [100]. Les deux autres sous-unités du complexe sont Ycg1 et Ycs4. Ces deux sous-unités, ainsi que Brn1, forment un hétéro trimère essentiel à la stimulation de l'activité ATPase par l'ADN et aux activités spécifiques de condensine [101].

Tout comme cohésine, l'activité ATPase de condensine est indispensable à son fonctionnement *in vivo* [102]. Les monomères Smc2 et Smc4 ne possèdent pas d'activité ATPase intrinsèque. Par contre, lorsque associés sous forme de dimère, ils présentent une

activité ATPase [55, 101]. Pareillement, en utilisant les monomères ou dimères SMC, aucune stimulation de l'activité ATPase par l'ADNdb ne se produit. Pourtant, en utilisant le complexe condensine entier (hétéro pentamère), une stimulation de l'activité ATPase par l'ADNdb survient [53, 101, 103]. Ainsi, l'ATP n'a pas d'effet sur la liaison à l'ADN de condensine, mais est requis pour ses activités biochimiques spécifiques [53].

Plusieurs études établirent la liaison à l'ADN du dimère SMC (Smc2 et Smc4) [55, 97, 101, 103]. Cette association entre le dimère SMC et l'ADNdb est coopérative et provoque son agrégation [55, 103]. Les sous-unités régulatrices présentent sous forme d'hétéro trimère, quant à elles, peuvent aussi se lier à l'ADN [101]. Cependant, seul l'hétéro pentamère est capable de se lier à des chromosomes [101]. Sur l'ADNdb nue, la liaison de l'hétéro pentamère provoque l'apparition de plusieurs bandes discrètes au lieu d'une agrégation comme le dimère Smc2-4 [103]. Aussi, il existe une différence très marquée dans la liaison du dimère SMC ou de l'hétéro pentamère à de l'ADN sous forme de croix [98]. Finalement, une étude sur les protéines entières démontra que le site de liaison à l'ADN se situe dans le domaine «hinge» et/ou dans la région adjacente du domaine «coiled-coil» [103]. Par la suite, une seconde étude démontra que le site minimal de liaison à l'ADN sur condensine est situé dans le domaine «hinge» ainsi que la région adjacente du domaine «coiled-coil» [27]. Cependant, cette liaison à l'ADN est possible seulement si une partie ou la totalité de l'ADN est présente sous forme simple brin [27].

Condensine possède 5 fonctions spécifiques. L'hybridation de brin d'ADN complémentaire est la première (figure 1.7A) [54]. Bien que le dimère Smc2-4 présente une très bonne activité d'hybridation, cette activité n'est pas retrouvée chez les monomères SMC. La seconde fonction spécifique comprend la formation de courbures dans l'ADN créées par la compaction de l'ADN par le dimère Smc2-4 [104]. La troisième fonction du dimère consiste en la formation de noeuds à trois jonctions (figures 1.6B) [55, 104]. Comme MukB, la présence de topoisomérase II est essentielle à la formation de ce type de noeud. En plus du dimère Smc2-4, l'hétéro pentamère permet aussi la formation de noeud [105]. La quatrième fonction du complexe condensine est le super enroulement de l'ADN [53, 85, 101, 106-108]. Seul l'hétéro pentamère est capable de supporter une telle activité [55, 101]. Contrairement à MukB, condensine permet l'insertion de torsions positives à l'intérieur d'un fragment d'ADNdb circulaire [53, 107]. Finalement, le complexe condensine possède la faculté de contracter l'ADN comme MukB et cohésine [108].

Maintenant que les complexes cohésine et condensine, ainsi que leurs activités biochimiques, sont brièvement décrits, il est possible d'aborder en profondeur le complexe Smc5-6, de son architecture jusqu'à ses fonctions biologiques.

1.3) Le complexe Smc5-6

Comme cohésine et condensine, le complexe Smc5-6 est composé de 2 sous-unités SMC (Smc5 et Smc6) ainsi que de quatre à six sous-unités régulatrices. Ces sous-unités régulatrices portent le nom de «non-SMC elements» ou NSE. Chez les levures, les sous

unités régulatrices présentent vont de Nse1 à Nse6, alors que chez l'humain, on retrouve seulement les sous-unités Nse1 à Nse4 (figure 1.9). En se basant sur les éléments structuraux de cohésine et condensine comme point de départ, une ébauche primaire du complexe Smc5-6 apparaît. Cette ébauche est surtout basée sur les études biochimiques et le système de double hybride en levure [39, 109-112].

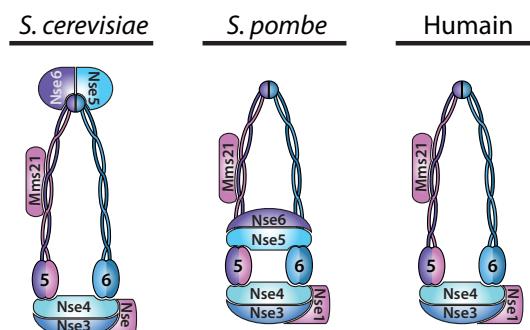


Figure 1.9

Représentation schématique du complexe Smc5-6 chez *S. cerevisiae*, *S. pombe* et chez l'humain. Figure reproduite et modifiée avec la permission de l'auteur.

1.3.1) Architecture et biochimie du complexe Smc5-6

Le premier membre du complexe Smc5-6 fut découvert en 1975 lors d'un criblage génétique chez *S. pombe* réalisé pour trouver de nouveaux gènes impliqués dans la réparation de l'ADN. À l'époque, la protéine fut nommée Rad18 puisqu'elle présentait la particularité d'augmenter la sensibilité aux radiations ionisantes [113]. Ce n'est que 20 ans plus tard qu'il fut établit que Rad18 appartient plutôt à la famille des protéines SMC et qu'elle est impliquée dans la réparation des lésions causées par les radiations UV ainsi que dans la réparation des DSBs [25, 114]. Plus tard, la purification en condition native démontra que Smc6 fait parti d'un complexe de haut poids moléculaire qui contient au

moins 6 protéines. Une de ces protéines, Spr18 (Smc5), est le partenaire de dimérisation de Smc6 [115]. Finalement, le complexe Smc5-6 fut isolé chez l'humain, démontrant sa conservation au fil de l'évolution [19].

Le rôle de la sous-unité «kleisin» est joué par Nse4 qui, initialement, fut identifiée comme étant Rad62 chez *S. pombe* [116]. Les outils informatiques d'analyse de la structure prédirent l'existence de deux motifs à l'intérieur de la protéine Nse4. Ces deux motifs, le «helix-turn-helix» et le «winged-helix» sont caractéristiques de la famille des protéines «kleisin» [117]. Chez l'humain, deux isoformes de la protéine Nse4 existent. L'isoforme, Nse4b est exprimé seulement dans les testicules et possède 50 % d'homologie avec Nse4a [118, 119]. En tant que sous-unité «kleisin», Nse4 se lie aux têtes ATPase de Smc5 et Smc6. Ainsi, la partie C-terminale de Nse4 lie la tête ATPase de Smc5 alors que la partie N-terminale lie la tête ATPase de Smc6 [117]. En plus de ces interactions avec Smc5 et Smc6, Nse4 possède deux autres partenaires d'interaction, soient Nse1 et Nse3. D'ailleurs, ce dernier possède de multiples surfaces d'interaction avec Nse4 en plus de lier de façon indépendante Smc5 et Smc6 [110, 117, 120, 121].

Nse3 est impliquée dans la ségrégation normale des chromosomes ainsi que dans la résistance à de nombreux agents génotoxiques [122]. Ce membre du complexe Smc5-6 fait partie de la famille des protéines MAGE «Melanoma Antigen Gene» dont la fonction est liée à la régulation du cycle cellulaire, l'apoptose ainsi qu'au développement neuronal [39, 123]. Le génome humain encode 55 protéines MAGE et il fut récemment démontré que MAGEG1

est l'homologue de Nse3 chez l'humain [119]. Il est intéressant de réaliser que certaines protéines MAGE sont surexprimées dans différents types de cancers [123].

Le dernier partenaire d'interaction de Nse4 est Nse1. Ce dernier possède un domaine RING «Really Interesting New Gene» similaire à ceux retrouvés chez les protéines ayant une fonction ubiquitine ligase [124]. Au moment de sa découverte, malgré la présence d'un domaine RING, aucune activité ubiquitine ligase ne fut démontrée pour cette protéine. Cependant, la délétion ou la mutation du domaine RING chez *S. cerevisiae* confère un défaut de croissance alors que, chez *S. pombe*, cela augmente la sensibilité aux agents génotoxiques [111, 125]. D'ailleurs, certains auteurs proposèrent que le domaine RING serve d'élément structural à la formation du sous complexe Nse1-3-4 [111]. Il fut toutefois démontré que Nse1 peut être conjugué à l'ubiquitine *in vivo* [119]. Suite à cette découverte, la structure cristalline de Nse1 avec MAGEG1 (Nse3) démontre que l'interaction entre Nse1 et Nse3 module la structure du domaine RING de Nse1. En se servant de cette information, les auteurs démontrent que la présence de Nse3 donne une activité ubiquitine ligase à Nse1 [126].

La prochaine sous-unité du complexe Smc5-6 abordée est Nse2, aussi appelée Mms21. Cette sous-unité possède une version modifiée du domaine RING connu sous le nom de SP-RING «SIZ/PIAS RING». Ce domaine se trouve dans la partie C-terminale de la protéine et sa présence est associée à une activité E3 SUMO «Small Ubiquitin-like Modifier» ligase présente *in vitro* et *in vivo* [127-129]. Les cibles de cette activité E3 SUMO ligase sont

différentes d'une espèce à l'autre (voir tableau I) [130]. Bien que la protéine entière soit essentielle dans tous les organismes étudiés, la délétion ou mutation du domaine SP-RING confère une sensibilité accrue aux agents génotoxiques [130]. La partie N-terminale de Nse2 lui permet d'interagir avec le domaine «coiled-coil» de Smc5 [39, 109, 131]. C'est d'ailleurs la seule protéine, pour le moment, qui interagit directement avec le domaine «coiled-coil» d'une protéine SMC. Cette caractéristique spécifique de Nse2 soulève une question importante : cette protéine est-elle essentielle à la stabilité du complexe Smc5-6? En fait, bien que la délétion de Nse2 soit létale, cette létalité n'est pas due à une déstabilisation du complexe Smc5-6 [132].

Tableau I : Substrats connus de Nse2		
Protéines	Espèce(s)	Fonction
Bir1	<i>S. cerevisiae</i> [133]	Kinétochore
Kap114	<i>S. cerevisiae</i> [134]	Récepteur nucléaire d'import
Ku70	<i>S. cerevisiae</i> [129]	NHEJ
Nse2	Humain [128] <i>S. pombe</i> [127] <i>S. cerevisiae</i> [129]	HR
Ndc10	<i>S. cerevisiae</i> [133]	Kinétochore
Nse3	<i>S. pombe</i> [127]	HR
Nse4	<i>S. pombe</i> [135]	HR
RAP1	Humain [136]	Maintien télomère
SA2	Humain [137]	Cohésion Chromatides-sœurs
Scc1	Humain [137, 138] <i>S. cerevisiae</i> [139]	Cohésion Chromatides-sœurs
Smc5	<i>S. cerevisiae</i> [129]	HR
Smc6	Humain [128] <i>S. pombe</i> [127]	HR
Snf1	<i>S. cerevisiae</i> [140]	Métabolisme du carbone
TIN2	Humain [136]	Maintien télomère
TRAX	Humain [128]	Maintien télomère
TRF1	Humain [136]	Maintien télomère
TRF2	Humain [136]	Maintien télomère

Avant de décrire les deux dernières sous-unités du complexe Smc5-6, une description approfondit des mécanismes de conjugaison de l'ubiquitine et de la SUMO s'impose. En raison de la grande ressemblance entre ces deux voies de conjugaison, elles seront décrites conjointement en mettant en évidence les principales différences. Tout d'abord, les protéines ubiquitine (Ubi4) et SUMO (Smt3) possèdent toutes les deux une structure 3D ainsi qu'un poids moléculaire semblable [141-143]. Pourtant, elles partagent moins de 20% d'homologie au niveau de leur séquence en acide-aminés. Cette différence explique la spécificité de chacune des voies de conjugaison ainsi que la diversité de leurs effets cellulaires.

Au départ, les deux protéines sont synthétisées sous une forme inactive [144-146]. Cette forme inactive contient une séquence précise en C-terminale qui limite l'accessibilité au motif glycine-glycine pour la conjugaison sur une autre protéine. Le clivage de la partie C-terminale, juste après le motif glycine-glycine, est essentiel à la maturation de Ubi4 ou Smt3 [144, 146]. Après cette étape de maturation, la protéine est activée par l'enzyme d'activation (E1) qui crée un lien thio-ester entre Ubi4 ou Smt3 et elle-même [147-149]. La création de ce lien requiert l'hydrolyse de l'ATP ainsi que la présence d'un résidu cystéine sur l'enzyme E1. Cette action est accomplie par l'enzyme Uba1 pour l'ubiquitine et le dimère Aos1-Uba2 pour SUMO. Suite à l'activation de Ubi4 ou Smt3, ces dernières sont transférées de l'enzyme E1 à une enzyme de conjugaison (E2) par le transfert du lien thio-ester [150-153]. Contrairement à Uba1, la seule enzyme E1, il existe de nombreuses enzymes E2 pour l'ubiquitine dont Rad6. Pour la SUMO, il existe une seule enzyme E2 :

Ubc9. Finalement, l'enzyme E2 transfère Ubi4 ou Smt3 à la protéine d'intérêt par la création d'un lien iso-peptidique entre le résidu glycine de Ubi4 ou Smt3 et la chaîne latérale d'une lysine. Ce processus de transfert vers la protéine d'intérêt est facilité par la présence d'une enzyme ligase (E3) [154-156]. L'enzyme E3 permet une plus grande spécificité au niveau de la protéine d'intérêt. Pour l'ubiquitine et la SUMO, il existe de nombreuses E3-ligases dont Rad18 et Nse2 chez *S. cerevisiae*. Finalement, Ubi4 et Smt3 peuvent être retirés de la protéine d'intérêt grâce à des protéases spécifiques [157-159].

Les effets de ces modifications post-traductionnelles sur la protéine d'intérêt sont très variés. La première fonction reconnue de l'ubiquitine fut de diriger les protéines vers la dégradation par le protéasome [160]. Maintenant, il est reconnu que l'ubiquitine est aussi impliquée dans la transcription, l'endocytose, la régulation du cycle cellulaire et la réparation de l'ADN [161-163]. La conjugaison de SUMO à une protéine permet de la diriger vers un endroit spécifique de la cellule [164]. La modification par sumoylation permet aussi l'activation ou l'inhibition de la transcription, ou encore le maintien de l'intégrité génomique [165-168]. De plus, il semblerait que l'inhibition de la transcription puisse aussi être médiée par un complexe tertiaire composé de PIAS1, SUMO1 et UBC9, et ce, sans conjugaison de SUMO1 à une autre protéine [169].

Les deux dernières sous-unités du complexe Smc5-6, soient Nse5 et Nse6, semblent être présentes, pour l'instant, uniquement chez les levures et la plante *Arabidopsis thaliana* [112, 129, 170]; aucun homologue fonctionnel n'a encore été retrouvé chez l'humain.

L'analyse de la séquence primaire de Nse5 ne met pas en évidence la conservation de domaines connus. Pour sa part, Nse6 contient des répétitions «ARM/Heat» [112, 117] ayant pour fonction l'interaction entre deux protéines, la reconnaissance de la matrice nucléaire ou des composants de la chromatine [171, 172]. Ces répétitions possèdent la propriété intéressante d'apporter de l'élasticité lors d'interactions protéine-protéine [173] et sont aussi retrouvées dans la séquence primaire de certaines sous-unités de condensine et cohésine [174]. Ensemble, Nse5 et Nse6 forment un sous-complexe qui interagit avec les têtes ATPase de Smc5 et Smc6 chez *S. pombe*, alors que, chez *S. cerevisiae*, ces deux mêmes sous-unités interagissent avec le domaine «hinge» de Smc5 et Smc6 [110, 112, 117]

La biochimie du complexe Smc5-6 est malheureusement encore mal étudiée. Pour le moment, il est reconnu que l'activité ATPase du complexe Smc5-6 est essentielle à ses activités *in vivo* [114, 115]. D'ailleurs, une mutation dans le motif c de Smc6 permet de faire la différence entre la fonction du complexe dans la réparation de l'ADN et une autre fonction essentielle [115]. Plus récemment, il fut démontré que la délétion totale de la protéine Smc6 chez la souris est létale alors qu'une mutation dans le motif c est viable [175]. Ces dernières présentent toutefois plusieurs phénotypes associés à la mutation dans le motif c, mais les auteurs expliquent encore mal le lien avec le complexe Smc5-6 [175].

En ce qui concerne la liaison à l'ADN, il est bien établit dans la littérature que le complexe Smc5-6 peut se lier à différents loci sur les chromosomes [176, 177]. Cette visualisation de la liaison du complexe Smc5-6 aux chromosomes fut réalisée *in vivo*. La

seule information permettant de penser qu'une interaction directe entre le complexe Smc5-6 et l'ADN nue existe est une stimulation de son activité ATPase par de l'ADNdb [115].

1.3.1.1) Implication des membres du complexe Smc5-6 dans le cancer

L'oncogène *MYCN* est relié à un sous-type de neuroblastome très agressif. L'amplification de cet oncogène corrèle avec un mauvais pronostic chez les patients atteints de ce type de tumeur [178-180]. *MYCN* est présent sur le chromosome 2 du génome humain [181] et son amplification est souvent accompagnée de l'amplification d'autres gènes comme *DDX1* [182]. Pour sa part, la co-amplification de *DDX1* est associée à un meilleur pronostic ainsi qu'à un meilleur taux de survie. Parmi les gènes pouvant être co-amplifiés se trouvent *NSE1* et *SMC6* [183-185]. L'effet de leurs co-amplifications n'est cependant pas encore déterminé. Une protéine de fusion entre *FAM49A* et *SMC6* fut aussi détectée dans un neuroblastome conjointement à une amplification de l'oncogène *MYCN* [181]. Par contre, le rôle de cette protéine de fusion dans l'apparition ou l'accroissement de la tumeur n'est pas encore défini.

Dans le cancer de la prostate, le gène *NSE1* est régulé par méthylation [186]. Ainsi, la méthylation de *NSE1* en fait un bon bio marqueur dans la détection du cancer de la prostate. D'ailleurs, la technique combinant l'utilisation de la méthylation du gène *NSE1* avec le gène *SPOCK2* possède une sensibilité de 80% et une spécificité de 95% dans la détection des cellules cancéreuses [186].

Une étude menée en 2012 a démontré que certaines délétions hémizygotiques sont plus fréquemment rencontrées chez les patients atteints de cancer et pourraient, selon les auteurs, apporter un avantage prolifératif aux cellules [187]. L'une de ces délétions contient le gène *SMC6*.

1.3.2) Localisation cellulaire du complexe Smc5-6

La localisation du complexe Smc5-6 fut étudiée dans plusieurs organismes [19, 135, 176, 188, 189]. Chez *S. pombe*, le complexe Smc5-6 est localisé sur toute la longueur des chromosomes. Cette observation est aussi valable pour la levure *S. cerevisiae* [176]. Cependant, un enrichissement du complexe Smc5-6 est détecté dans les régions intergéniques, aux centromères, aux télomères ainsi que sur l'ADN ribosomale (rDNA) [135, 176, 177]. La présence du complexe Smc5-6 aux régions intergéniques et aux centromères est secondaire à un facteur de chargement, soit le complexe Scc2-Scc4 [176]. Ce complexe est essentiel au chargement de cohésine et condensine sur l'ADN [190, 191]. En revanche, l'association du complexe Smc5-6 au rDNA est indépendante du complexe Scc2-Scc4 [176, 177]. Le point commun au rDNA et aux télomères est la présence d'hétérochromatine, mais comment arrive-t-elle à réguler l'association du complexe Smc5-6?

1.3.2.1) Structure et modifications post-traductionnelles de la chromatine

L'unité de base de la chromatine est le nucléosome [192]. Ce dernier est constitué d'un octamère d'histones autour duquel s'enroule ~ 147 bp d'ADN. L'octamère d'histones est, quand à lui, composé de deux copies de chaque histone (H2A, H2B, H3 et H4). La

stabilité du nucléosome repose sur trois types d'interactions [192-194]. Tout d'abord, les histones s'assemblent grâce à des interactions protéine-protéine. Ensuite, des liens électrostatiques et des ponts hydrogènes maintiennent l'ADN autour de l'octamère d'histones.

La queue N-terminale des histones est très flexible et pointe vers l'extérieur du nucléosome [195]. Deux fonctions sont associées à cette partie des histones : elles rendent possible des interactions avec les nucléosomes adjacents ou les facteurs nucléaires et elles permettent la modification post-traductionnelle des histones [195]. Ces modifications servent à altérer la structure de la chromatine ou de site d'interaction pour les facteurs nucléaires.

La liaison de l'ADN autour de l'octamère d'histone crée la fibre de 10nm qui peut être compactée en une fibre de 30nm grâce aux interactions entre les histones et/ou aux facteurs de remodelage de la chromatine [196-199]. Les interactions entre cohésine, condensine et la topoisomérase II avec la fibre de 30nm permettent la formation et la stabilisation des fibres en chromosome [200-202]. Ce modèle fut proposé suite aux expériences biochimiques et aux résultats de microscopie électronique et de «Small-angle X-ray scattering» [203-209]. Cependant, des études de microscopie électronique réalisées sur des échantillons congelés dans l'azote liquide réfutent l'existence de la fibre de 30nm à l'intérieur des chromosomes [210-212]. En effet, ces expériences indiquent que les

chromosomes sont plutôt constitués d'une fibre de 10nm compactée de façon irrégulière [213].

La chromatine existe sous deux formes, l'euchromatine, qui contient la majorité des gènes, et l'hétérochromatine, qui contient peu de gènes [214]. Le niveau de compaction est une autre différence majeure entre ces deux formes de chromatine. En effet, l'hétérochromatine est fortement compactée comparativement à l'euchromatine qui l'est beaucoup moins [214]. L'hétérochromatine est aussi caractérisée par la présence de séquences d'ADN répétées aux télomères, aux loci *HMR* et *HML* ainsi que le rDNA [215, 216]. Chez les eucaryotes, ces régions d'ADN présentent une faible acétylation et une forte méthylation des histones H3 et H4 et sont caractérisés par la présence de la protéine HP1 [217-219]. Chez la levure *S. cerevisiae*, les histones de l'hétérochromatine contiennent une faible acétylation des histones H3 et H4. Aussi, la protéine HP1 est remplacée par le complexe SIR «Silent Information Regulator» [220-223].

Le complexe SIR est composé de trois sous-unités Sir2, Sir3 et Sir4 [224-227]. Sir3 et Sir4 rendent possible l'interaction avec les nucléosomes [228-231]. De son côté, Sir2 permet la déacétylation des histones. Cette activité enzymatique requiert le NAD et est stimulée par la présence de Sir4 [232-234]. Le complexe SIR ne reconnaît aucune séquence spécifique d'ADN. Ainsi, la localisation du complexe SIR au niveau des loci HM requiert la présence des protéines Orc et Abf1 [235-239]. Au niveau des télomères, la localisation du complexe SIR dépend de la protéine Rap1 ainsi que du complexe KU [240-244]. La

propagation du complexe SIR et, par le fait même, de l'hétérochromatine, est limitée par deux facteurs, soient la méthylation de H3K79 et l'acétylation de H3K56 [245-247].

Sir2 est la seule protéine requise pour la formation de l'hétérochromatine au locus du rDNA [248-250]. À ce locus précis, le complexe RENT «REgulator of Nucleolar silencing and Telophase exit» permet la génération de l'hétérochromatine [251-253]. En plus de Sir2, le complexe RENT contient les protéines Net1 et Cdc14 [251, 253]. La localisation du complexe RENT au locus du rDNA dépend de l'interaction entre la protéine Fob1 et Net1 et/ou Sir2 [254].

Chez cohésine, la liaison à l'ADN dépend de l'état de la chromatine au locus *HMR*. En effet, chez *S. cerevisiae*, une souche qui perd les protéines Sir3, Sir4 ou l'activité enzymatique de Sir2 perd aussi la liaison de cohésine à ce locus [255]. Au niveau du rDNA, l'association de cohésine est dépendante de la protéine Sir2 [256]. Plusieurs études chez *S. pombe* et chez les cellules humaines démontrent l'existence d'une interaction entre Scc2 et la protéine Swi6/HP1 [257-259]. Par conséquent, serait-il possible que le complexe Smc5-6 utilise les protéines de l'hétérochromatine comme cohésine pour s'associer avec les télomères et le rDNA? Cette hypothèse, bien qu'elle soit intéressante, reste à confirmer.

1.3.2.2) Le cycle cellulaire et la liaison à l'ADN du complexe Smc5-6

La liaison du complexe Smc5-6 à différents sites sur les chromosomes est régulée durant le cycle cellulaire [176]. Tout d'abord, le chargement du complexe sur l'ADN débute

durant la phase S et est couplé à la réPLICATION de l'ADN [135, 176, 189]. Le chargement du complexe Smc5-6 se poursuit durant l'entièreté de la phase S pour atteindre son paroxysme en fin de phase S chez *S. pombe* ou en phase G2/M chez *S. cerevisiae* [135, 176]. Finalement, la dissociation du complexe Smc5-6 s'effectue durant la mitose. Chez l'humain et la grenouille *Xenopus*, la complétion de cette dissociation coïncide avec l'accumulation du complexe condensine sur les chromosomes [19, 189]. Chez *S. cerevisiae*, ce paramètre demeure encore inconnu. Cependant, la dissociation semble avoir lieu seulement après la métaphase, puisqu'en présence de nocodazole (poison des microtubules), le complexe Smc5-6 demeure associé aux chromosomes [176, 177].

1.3.2.3) Impact du complexe de chargement Scc2-Scc4

Tel que discuté, la liaison du complexe Smc5-6 à l'ADN est influencée par le complexe de chargement Scc2-Scc4, à l'exception de la région du rDNA. Pour mieux comprendre cette régulation, l'interaction entre le complexe cohésine et les protéines Scc2-Scc4 doit être explorée. Tout d'abord, il est important de réaliser que le chargement du complexe cohésine sur l'ADN *in vitro* est indépendant d'un complexe de chargement [260]. Cependant, la présence du dimère Scc2-Scc4 stimule et augmente l'activité de chargement [260]. *In vivo*, les protéines Scc2-Scc4 sont requises pour le chargement de cohésine sur l'ADN durant la phase G1, contrairement aux phases S et G2 où elles ne sont pas essentielles [190, 261]. Ces évidences suggèrent que le complexe Scc2-Scc4 soit seulement requis pour le chargement initial de cohésine sur l'ADN.

Une autre observation intéressante au sujet du complexe de chargement est la différence avec cohésine en ce qui concerne sa localisation sur les chromosomes. En effet, le complexe de chargement se retrouve principalement dans la région promotrice des gènes hautement exprimés [191, 262]. Dans le cas du complexe cohésine, il est enrichi au centromère ainsi que dans les régions intergéniques se trouvant entre deux gènes hautement transcrit par l'ARN polymérase II [23, 262, 263]. Le fait que cohésine lie l'ADN de façon topologique peut expliquer cette différence de localisation. Ainsi, l'ARN polymérase a la possibilité de pousser cet anneau sur l'ADN [82]. Cependant une mutation dans le domaine ATPase de Smc1 ou Smc3 a le pouvoir d'abolir cette différence de localisation [50, 264]. En effet, ces mutants localisent aux sites de liaison à l'ADN du dimère Scc2-Scc4.

L'interaction topologique de cohésine avec l'ADN a pour conséquence l'emploi d'un complexe de chargement. En effet, un anneau fermé ne peut être chargé sur l'ADN et le contenir en son centre s'il n'a pas d'ouverture. Cohésine forme un anneau fermé, une ouverture doit être créée pour permettre à l'ADN d'entrer à l'intérieur de l'anneau. La fonction d'ouverture semble être accomplie par le complexe de chargement Scc2-Scc4. Une interaction physique entre le complexe cohésine et le dimère Scc2-Scc4 fut démontrée dans plusieurs études [50, 265]. Une analyse subséquente démontra que l'anneau formé par cohésine forme de multiples interactions avec le complexe Scc2-Scc4. Cependant, le site principal d'interaction semble se trouver au niveau de la sous-unité Scc3 du complexe cohésine [260]. Pour déterminer l'endroit exact où se crée l'ouverture de l'anneau, une équipe effectua une fusion entre la protéine Smc1 et Scc1 de même qu'entre Smc3 et Scc1.

Les protéines de fusion obtenues ne permettent plus l'ouverture de la tête ATPase d'un côté comme de l'autre. L'intégration d'une telle protéine de fusion n'est pas létal chez la levure *S. cerevisiae* [266]. La même étude démontre que le changement du domaine hinge sur Smc1 et Smc3 par un autre domaine hétéro dimérisation est létal chez la levure *S. cerevisiae*, même si cohésine est toujours capable de former un anneau [266]. Ainsi, il semble que l'ouverture de l'anneau formé par cohésine se déroule au niveau du domaine «hinge». Un tel modèle de chargement pose un problème de taille pour le complexe Smc5-6 chez *S. cerevisiae*. En effet, le «hinge» est lié par le dimère Nse5-6 de façon constante durant le cycle cellulaire. Ainsi, ces deux protéines ont le potentiel d'interférer avec l'ouverture du domaine «hinge» pour le complexe Smc5-6. Cette problématique sera abordée plus longuement dans la discussion.

1.3.3) Fonctions biologiques du complexe Smc5-6

La mutation de n'importe quels gènes encodant une protéine du complexe Smc5-6 se traduit par une sensibilité accrue à un large éventail d'agents génotoxiques allant des radiations ionisantes jusqu'aux agents bloquant la fourche de réPLICATION, comme le méthyle méthane sulfonates (MMS) [19, 25, 112, 119, 122, 128, 137, 267]. Cette sensibilité à autant d'agents endommageant l'ADN semble signifier l'existence d'un défaut dans l'activation du point de contrôle intra-S [114]. Or, aucun mutant analysé jusqu'à maintenant ne met en évidence ce type de défaut [127, 268-271]. En effet, les mutants démontrent une cinétique ainsi qu'une intensité du point de contrôle intra-S normales. De plus, ils interrompent le cycle cellulaire pour permettre la réparation de l'ADN et ce, même au

niveau du rDNA [272]. Le problème réside dans le fait qu'ils retournent dans le cycle cellulaire sans avoir complété la réparation de l'ADN [114, 127, 188, 269-271]. Même l'imposition d'un arrêt artificiel durant la phase G2 du cycle cellulaire ne réduit pas la létalité des mutants du complexe Smc5-6. Pourtant, ce même type d'arrêt diminue la sensibilité du mutant *rad3-136* (*Mec1/ATR*) aux agents génotoxiques chez *S. pombe* [114].

Pour faire suite à ces résultats, différentes analyses génétiques menées chez *S. cerevisiae* et *S. pombe* démontrent que la fonction du complexe Smc5-6 réside dans la réparation des lésions par homologie de séquence (HR). En effet, chez *S. pombe*, le mutant *rad18-X* (*SMC6*) est moins sensible que le mutant *rhp51* (*RAD51*) aux IRs alors que le mutant conjoint est aussi sensible que *rhp51* seul [25]. De plus, les mutants *smc6-X* et *smc6-74* sont plus sensibles à l'hydroxyurée (HU) et aux UVs que la délétion de *rhp51* alors que le mutant conjoint y est moins sensible [188]. Chez *S. cerevisiae*, la survie cellulaire des mutants *smc6-9*, *smc5-31* et *smc5-33* augmente avec la délétion des protéines Rad51 ou Rad52 [112, 177, 268, 270, 273]. Les mutants du complexe Smc5-6, lorsque combinés avec la délétion de *SGS1* ou la délétion de *MUS81*, majorent la létalité [111, 112, 116, 122, 270]. *Sgs1*, une hélicase et *Mus81*, une endonucléase, sont toutes deux requises pour la résolution des jonctions entre les intermédiaires de recombinaison. D'ailleurs, ces intermédiaires deviennent cytotoxiques en présence de mutants du complexe Smc5-6 [112, 125, 188, 268, 274]. En effet, les mutants du complexe Smc5-6 sont incapables de résoudre les intermédiaires de recombinaison, ce qui conduit à une fragmentation des chromosomes lors de leur séparation au cours de la mitose.

Bien que le complexe Smc5-6 soit impliqué dans la réparation des lésions par HR, il est aussi impliqué dans d'autres processus. Par exemple, le complexe Smc5-6 est requis pour la complétion adéquate de la réplication de l'ADN, ainsi que pour le maintien de l'homéostasie du rDNA et des télomères. Pour une lecture plus aisée de cette thèse, les différentes fonctions du complexe Smc5-6 seront présentées séparément dans les prochaines pages. Une vue d'ensemble des fonctions du complexe Smc5-6 est néanmoins disponible à la figure 1.10.

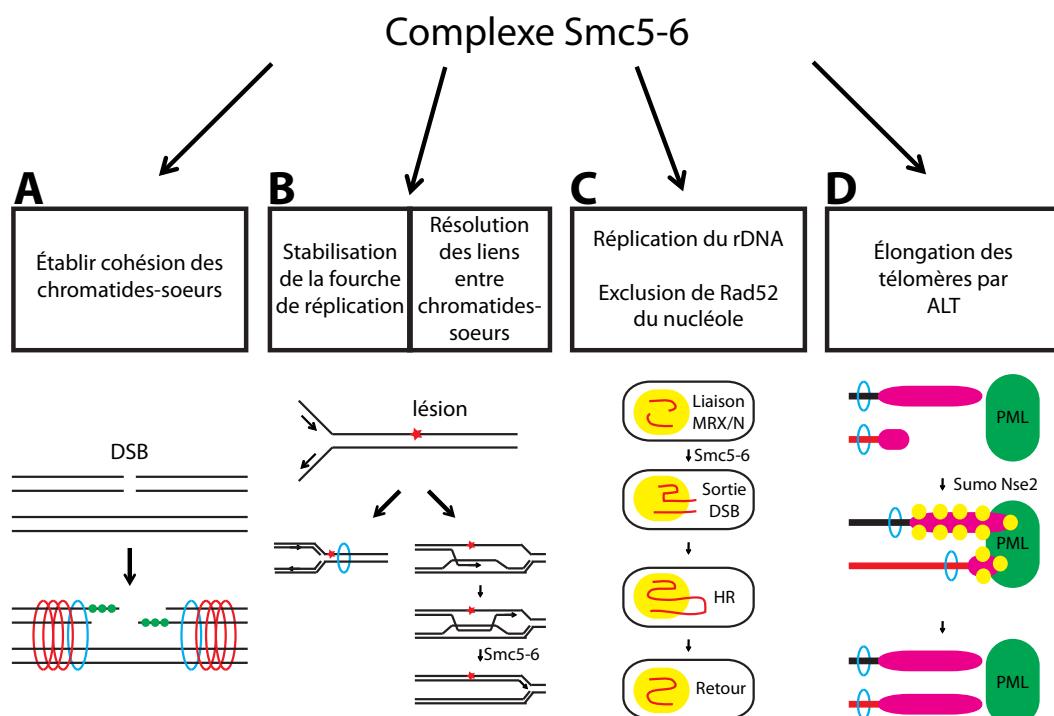


Figure 1.10

Représentation schématique des différentes fonctions du complexe Smc5-6.
 A) L'anneau bleu représente le complexe Smc5-6 alors que l'anneau rouge représente cohésine. Les billes verte représente RPA.
 B) L'anneau bleu représente le complexe Smc5-6 alors que l'étoile rouge est la lésion sur l'ADN.
 C) Le cercle jaune représente le nucléole et la ligne rouge le rDNA.
 D) L'anneau bleu représente le complexe Smc5-6 alors que les lignes rouge et noire sont deux chromosomes. La partie mauve des chromosomes représente les télomères. Finalement, le cercle jaune représente la sumoylation des télomères.

1.3.3.1) La réparation d'un bris double brins

L'altération la plus dommageable au matériel génétique (ADN) d'une cellule est le DSB [275]. Mal réparé, il peut conduire à l'instabilité génomique et au développement de cancers. C'est pourquoi les cellules eucaryotes ont développé deux mécanismes principaux de réparation du DSB : la réparation par jonction de brins non homologues (NHEJ) et la réparation par homologie de séquence (HR) [276]. Une vue d'ensemble de la réparation par HR est disponible à la figure 1.11.

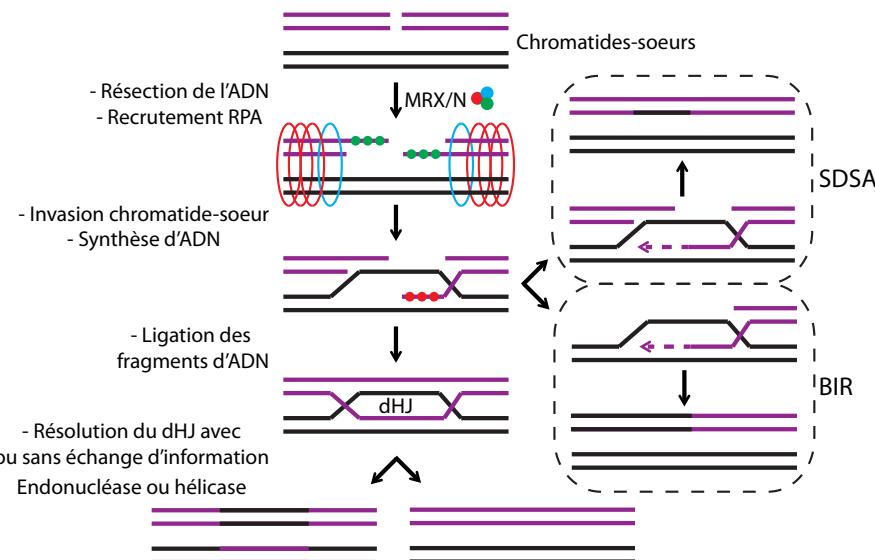


Figure 1.11

Représentation schématique de la réparation de l'ADN par HR. Lorsqu'un DSB apparaît, le complexe MRX/N est le premier à être recruté. Il va initier la résection de l'ADN. En même temps, les complexes Smc5-6 (anneau bleu) et cohésine (anneau rouge) vont établir la cohésion entre les chromatides-soeurs. RPA (billes vertes) va lier l'ADNsb puis être remplacé par Rad51 (billes rouges) pour l'invasion de la chromatide-soeur. Suite à l'invasion, différentes voies de réparations peuvent être utilisées telles que le SDSA, le BIR ou la formation d'un dHJ.

Le choix entre ces deux mécanismes de réparation dépend de la structure de l'ADN aux extrémités du DSB. En effet, l'initiation de la résection provoque une diminution de l'affinité des protéines KU pour l'ADN. Ce changement dans la structure de l'ADN permet l'utilisation du HR par les cellules [277, 278]. Un autre facteur important dans la détermination du mécanisme de réparation utilisé est la phase du cycle cellulaire. Par exemple, le HR est coordonné pour arriver durant la phase S et G2 du cycle cellulaire. Ces phases coïncident avec la réPLICATION de l'ADN, permettant ainsi à une chromatide-sœur de servir de gabarit pour la réparation par HR [277, 279-281]. Outre la présence d'une chromatide-sœur, un autre déterminant majeur est l'activité des protéines kinase dépendantes d'une cycline (CDK) au cours d'un cycle cellulaire [277, 279].

Dans le cas où le HR prime, les extrémités du DSB sont liées par le complexe Mre11-Rad50-Xrs2/NBS1 (MRX/N) qui joue le rôle de senseur tout en permettant de conserver une certaine proximité entre les extrémités [282, 283]. C'est d'ailleurs ce complexe qui permet le recrutement de Tel1/ATM «ataxia telangiectasia mutated» au DSB par une interaction directe [282, 283]. Dans le processus de réparation par HR, les protéines H2AX, Xrs2/NBS1 et Mre11 sont ensuite phosphorylées, ce qui initie la réparation de l'ADN ainsi que l'activation du point de contrôle [284, 285]. Le complexe MRX/N recrute alors la protéine Sae2/CtIP au DSB pour permettre la phosphorylation de cette dernière par Tel1/ATM [286, 287]. Après le recrutement de Sae2/CtIP, la résection de l'ADN débute, ce qui permet de dégager une extrémité 3' d'ADNsb. L'apparition d'ADNsb est essentielle pour le transfert de Tel1/ATM à Mec1/ATR dans le signalement du DSB [288].

Le processus de résection de l'ADN s'effectue en deux étapes [289, 290]. Tout d'abord, pour permettre la formation d'une petite extrémité 3' d'ADNs_b, la résection des premiers 50 à 100 nts de l'extrémité 5' est effectué par le complexe MRX/N en partenariat avec Sae2/CtIP [289, 290]. Le complexe MRX/N et Sae2/CtIP se dissocient ensuite de l'ADN pour enclencher le deuxième processus de résection [291]. La dissociation du complexe MRX/N permet la liaison du complexe RPA à l'ADNs_b. La deuxième étape de résection de l'ADN est possible grâce à la redondance entre deux voies de dégradation (5' vers 3') de l'ADN. La première de ces voies repose sur l'exonucléase Exo1 tandis que la seconde voie fait appel au complexe Sgs1-Top3-Rmi1, composé d'hélicase et de topoisomérase, ainsi qu'à la collaboration de Dna2, une endonucléase [289, 290, 292]. Cette deuxième étape de résection permet la formation de 2 à 4 kb d'ADNs_b [293]. La liaison du complexe RPA à l'ADNs_b empêche la formation de structure secondaire qui nuirait au HR [294].

La liaison de RPA à l'ADNs_b permet le recrutement de Mec1/ATR par l'interaction entre RPA et Ddc2/ATRIP [295-297]. De plus, RPA permet de recruter l'anneau, composé de Ddc1-Rad17-Mec3 (RAD9-RAD1-HUS1), ce qui donne à Mec1/ATR une meilleure accessibilité à ses substrats [298, 299]. Cet anneau permet aussi de recruter Dpb11 (TopBP1) pour stimuler l'activité de Mec1/ATR [300, 301]. Finalement, la liaison de Rad9 (53BP1) à H2AX et à Dpb11 (TopBP1) permet sa phosphorylation par Mec1/ATR [302-305]. L'affinité de Rad53 (CHK1) pour Rad9 (53BP1) augmente après sa phosphorylation et la liaison de Rad53 à la forme phosphorylée de Rad9 est requise pour que Mec1/ATR puisse

phosphoryler Rad53 (CHK1) [306]. La phosphorylation de Rad53 (CHK1) permet l'activation du point de contrôle ainsi que l'arrêt du cycle cellulaire [307].

Suite à l'activation du point de contrôle, pour que le processus de HR puisse prendre place, le complexe RPA doit être déplacé de l'ADNsb [308]. Pour ce faire, Rad52 interagit avec Rad51 et RPA [309, 310]. Cette interaction est essentielle pour le remplacement de RPA par Rad51 sur l'ADNsb [311, 312]. La liaison de Rad51 à l'ADNsb favorise la formation d'un nucléo-filament dont la fonction est la recherche d'une séquence homologue dans le génome pour en faire l'invasion et créer un hétéro duplexe d'ADN (D-loop) [313]. Après l'invasion, l'anneau PCNA «Proliferating Cell Nuclear Antigen» est chargé sur l'ADN par le «Replication Factor C» (RFC) qui permet l'ouverture et la fermeture de l'anneau PCNA autour de l'ADN [314-317]. Le chargement de l'anneau PCNA requiert l'hydrolyse de l'ATP et est essentiel pour que la synthèse d'ADN ait lieu [318, 319]. Pour que le dépôt de l'anneau PCNA ait lieu au bon endroit, c'est-à-dire à la jonction entre l'ADNsb et l'extrémité 3' du nucléo-filament, le complexe RFC doit interagir avec RPA [315, 320, 321]. Finalement, l'anneau PCNA recrute une des polymérasées suivantes : δ , η , ou ξ pour effectuer la synthèse d'ADN [318, 322-325].

Suite à l'initiation de la synthèse d'ADN, plusieurs intermédiaires de recombinaison peuvent intervenir. Tout d'abord, l'interruption de l'extension du «D-loop» provoque le déplacement du brin d'ADN nouvellement synthétisé pour qu'il s'apparie avec l'autre extrémité du DSB. La réparation du bris est effectuée par la voie du SDSA «Synthesis

Dependent Strand Annealing» [326]. Les enzymes responsables du déplacement du brin d'ADN sont Srs2 et Mph1 chez *S. cerevisiae* et les homologues de BLM/WRN chez l'humain [327-329]. Cette voie de réparation ne permet cependant pas l'échange d'information entre les chromatides-sœurs.

Pendant l'extension du «D-loop», il arrive parfois que la fourche de réPLICATION soit assez stable pour qu'il n'y ait pas de déplacement du brin d'ADN nouvellement synthétisé. La synthèse d'ADN continue alors jusqu'à la fin du chromosome [330]. Cette voie de réparation, le BIR «Break Induced Replication», mène à une perte d'hétérozygotie puisqu'une partie des deux chromosomes homologues est identique.

Finalement, le dernier intermédiaire est créé lorsque le «D-loop» capture la deuxième extrémité du DSB, ce qui mène à la formation d'un «double Holliday Junction» dHJ après ligation des extrémités [331]. Suite à la formation du dHJ, deux voies peuvent résoudre cette structure. La première voie utilise une hélicase permettant la dissolution du lien entre les chromatides-sœurs [332]. Chez l'humain, le complexe BTR (BLM-Top3α-RMI1-RMI2) occupe cette place tandis que, chez la levure, le complexe STR (Sgs1-Top3-Rmi1) est utilisé [332-335]. La dissolution du lien ne permet pas l'échange d'information entre les chromatides-sœurs. La deuxième voie utilise des nucléases pour couper et résoudre le dHJ. En ce moment, plusieurs nucléases semblent occuper cette fonction, dont Mus81-Mms4/MUS81-EME1, Yen1/GEN1 et Slx1-Slx4/SLX1-SLX4 [336-343]. La façon dont le dHJ est coupé peut influencer ou non l'échange d'information entre les chromatides-sœurs.

1.3.3.2) Le complexe Smc5-6 et la réparation d'un DSB

L'inactivation du complexe Smc5-6 chez *S. cerevisiae*, *S. pombe*, la plante, le poulet et l'humain entraîne une réparation par HR défective entre les chromatides-sœurs [137, 344-346]. Grâce aux études génétiques, il est maintenant possible de constater que le complexe Smc5-6 agit dans la même voie de réparation que cohésine, c'est-à-dire qu'il promeut la recombinaison entre les chromatides-sœurs (figure 1.12) [137, 344, 347]. En effet, cohésine maintient la proximité entre la chromatide-sœur endommagée et celle intacte [89, 348-352]. Comme dans le cas de cohésine, le complexe Smc5-6 est recruté au DSB induit par des méga nucléases et ce, autant chez *S. cerevisiae* que chez l'humain [137, 176, 344]. Cependant, le recrutement à un DSB induit par la méga nucléase HO chez *S. cerevisiae* n'est possible que durant la phase G2/M du cycle cellulaire [176]. De plus, la liaison à l'ADN requiert Mre11, une sous-unité du complexe MRX/N, mais pas Mec1/ATR ou Rad53/CHK2 [176].

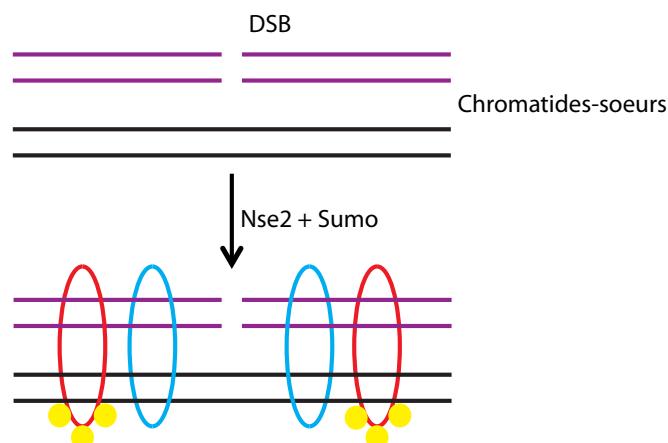


Figure 1.12

Représentation schématique de l'implication du complexe Smc5-6 dans le HR. Lorsqu'un DSB est détecté, les complexes Smc5-6 (anneau bleu) et cohésine (anneau rouge) vont se lier à l'ADN. Le complexe Smc5-6 via la sous-unité Nse2 va provoquer la sumoylation (cercles jaunes) de la sous-unité Scc1 de cohésine. Cette sumoylation va permettre d'établir la cohésion entre les chromatides-sœurs pour faciliter le HR.

Comment le complexe Smc5-6 promeut-il la recombinaison entre les chromatides-sœurs ? Une partie de la réponse se trouve au niveau de l'activité SUMO ligase de Nse2. En effet, la déplétion de Smc5 ou Nse2 chez l'humain abolit le recrutement de cohésine au DSB [137]. D'ailleurs, Nse2 est responsable de la sumoylation de deux sous-unités de cohésine, Scc1 et SA2/Scc3 [137]. Une forme de Scc1 ayant perdu tous les sites de sumoylation ne parvient pas à établir de cohésion au DSB [138, 139]. Pourtant, cette version mutante de Scc1 peut toujours se lier au DSB. Ainsi, la sumoylation de Scc1 active cohésine pour promouvoir la cohésion entre les chromatides-sœurs au DSB. Chez *S. cerevisiae*, le mutant *smc6-56* affecte cohésine de la même façon puisqu'il empêche la cohésion au DSB tout en laissant intact la liaison de cohésine à l'ADN [349].

Chez l'humain, la déplétion de Nse2 abolit aussi le recrutement de Smc5 au DSB [137]. Fait important, Nse2 est aussi responsable de la sumoylation de Smc6 chez l'humain [128]. Ainsi, il est raisonnable de supposer que la sumoylation de Smc6 soit requise pour la localisation du complexe Smc5-6 au DSB, mais ceci reste à prouver.

Finalement, chez *S. pombe*, il fut observé que le mutant double, *smc6-74* et *rad21-45* (Scc1), semble plus sensible aux IRs que les simples mutants. Cette observation tend à démontrer le rôle des deux complexes dans des voies de réparation indépendantes [114]. De plus, les mutants de cohésine ne conduisent pas à l'accumulation de structures aberrantes de recombinaison durant la réPLICATION de l'ADN, comme c'est le cas pour les

mutants du complexe Smc5-6 [273]. Ainsi, la fonction du complexe Smc5-6 à la fourche de réPLICATION semble être différente de sa fonction au DSB.

1.3.3.3) Le complexe Smc5-6 et les fourches de réPLICATION effondrées

Durant la réPLICATION de l'ADN, la fourche de réPLICATION rencontre parfois un obstacle sur l'ADN à réPLiquer. Cette rencontre interrompt l'activité de l'ADN polymérase [353]. Pour continuer la synthèse de l'ADN, la cellule peut employer différents mécanismes (figure 1.13). Tout d'abord, elle peut utiliser la voie du TLS «Translesion DNA Synthesis» qui conduit à l'ubiquitination de l'anneau PCNA par le dimère Rad6/Rad18 chez *S. cerevisiae* [354, 355]. L'ubiquitination de PCNA rend possible le recrutement d'une polymérase de moindre fidélité qui permet de dépasser la lésion. Pour outrepasser la lésion, la cellule peut aussi utiliser le HR à l'aide du recrutement de protéines de recombinaison [356]. Ce processus, le «template switching» permet l'utilisation de la chromatide-sœur nouvellement synthétisée comme gabarit pour poursuivre la synthèse au-delà de la lésion. Finalement, si la pause est trop longue, la fourche de réPLICATION peut s'effondrer et créer un DSB [353]. Le mécanisme employé par la cellule pour repartir à partir de ce type de fourche est le HR [357]. Il fut démontré, chez *S. cerevisiae*, que le complexe Smc5-6 se localise aux endroits où se trouve une fourche de réPLICATION effondrée [176]. Malgré cette nouvelle information, la fonction du complexe Smc5-6 à cet endroit demeure inconnue. Il est suggéré, dans la littérature actuelle, qu'il pourrait être impliqué dans la résolution des structures de recombinaison [358].

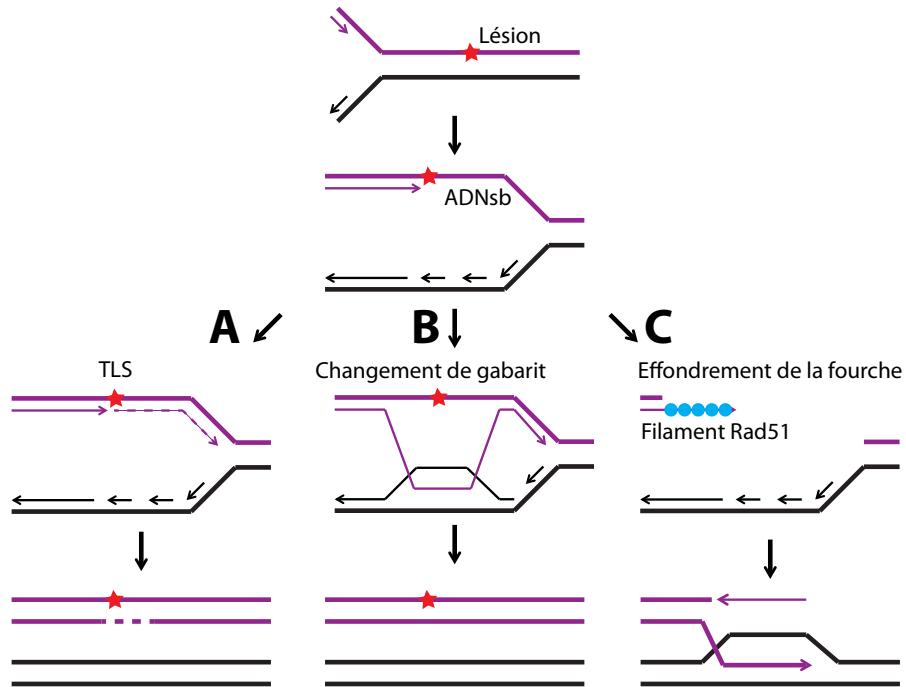


Figure 1.13

Représentation schématique des mécanismes pour outrepasser une lésion à l'ADN durant la réplication. A) Utilisation du TLS pour dépasser la lésion et ce grâce au recrutement d'une polymérase de moindre fidélité. B) Utilisation du changement de gabarit grâce au HR pour continuer la réplication en utilisant la chromatide-soeur. C) Effondrement de la fourche de réplication ce qui conduit à la formation d'un DSB. Pour continuer la réplication, la cellule va employer le HR.

Le complexe Smc5-6 a peut-être aussi un rôle à jouer avant l'effondrement de la fourche de réplication. En effet, il est impliqué dans la stabilisation de la fourche de réplication lorsqu'elle fait une pause, en vue d'accomplir le changement de gabarit. Cette fonction est divisée en deux étapes (figure 1.14). Tout d'abord, le complexe Smc5-6 est requis pour la liaison de RPA et Rad52 à la fourche de réplication en pause en vue d'accomplir l'invasion servant au changement de gabarit [359]. La deuxième étape consiste à favoriser la résolution des liens entre les chromatides-sœurs après la synthèse d'ADN [360],

361]. Pour bien comprendre la résolution de ces liens, il faut d'abord bien saisir les concepts entourant leur formation.

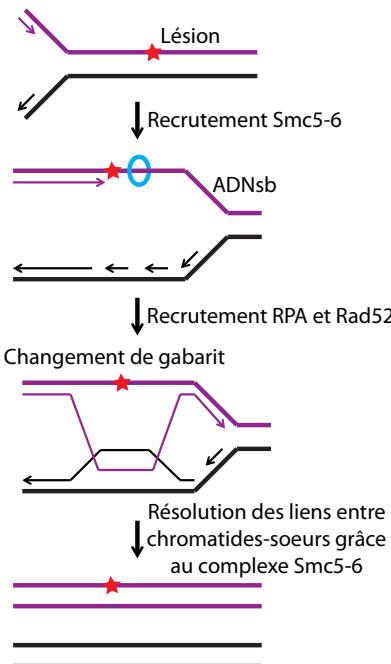


Figure 1.14

Représentation schématique de l'implication du complexe Smc5-6 lors du changement de gabarit. Tout d'abord, le complexe Smc5-6 (anneau bleu) permet le recrutement de RPA et de Rad52 à la fourche de réPLICATION bloquée. Ce recrutement permet l'invasion de la chromatide-soeur pour effectuer le changement de gabarit. Finalement, le complexe Smc5-6 est requis pour la résolution des liens entre les chromatides-soeurs.

Lors de la réPLICATION de l'ADN, des liens topologiques peuvent se former entre les chromatides-sœurs (SCJ) [362-364]. Suite à la formation de ces liens, il arrive parfois qu'une fourche de réPLICATION rencontre un obstacle et utilise le changement de gabarit pour passer outre. Ce processus mène à la formation de liens hémicaténaires [365]. La formation de SCJ est indépendante de Rad52, alors que la formation de liens hémicaténaires est dépendante de Rad52 [363, 365]. D'ailleurs, ce même type de liens apparaît chez les

mutants du complexe Smc5-6 [112, 125, 177, 188, 268, 274]. Ainsi, il est possible d'extrapoler que le complexe Smc5-6 soit requis pour résoudre ou prévenir la formation de ces liens hémicaténaires.

Cette fonction dépend de l'interaction physique entre Mph1 et le complexe Smc5-6. En effet, la délétion de Mph1 rend les mutants du complexe Smc5-6 moins sensibles aux agents génotoxiques [361, 366, 367]. Mph1 est une hélicase faisant partie de la famille de FANCM. Cette famille d'hélicases permet de démanteler certaines structures de l'ADN tel que les fourches de réPLICATION en pause [368]. Une étude récemment publiée a démontré qu'en l'absence d'un complexe Smc5-6 fonctionnel, Mph1 forme des oligomères aux fourches de réPLICATION en pause menant à la formation d'intermédiaires de recombinaison toxiques pour la cellule [369]. Ainsi, par l'interaction directe entre Smc5 et Mph1, le complexe Smc5-6 diminue la formation d'oligomères de même que le potentiel de démantèlement des fourches de réPLICATIONS en pause de Mph1. Cette interaction n'a toutefois aucun impact sur la fonction de Mph1 au niveau du D-loop.

Bien que la réPLICATION du génome en présence d'agents génotoxiques soit compliquée, certaines sections du génome sont difficiles à répliquer même sans agent endommageant l'ADN. C'est le cas du rDNA et des télomères, où l'effondrement de fourche de réPLICATION peut se produire de manière spontanée [370].

1.3.3.4) Homéostasie du rDNA et des télomères

Chez *S. cerevisiae*, l'organisation du rDNA est particulière. En effet, ce locus contient de 100 à 200 copies d'une même unité de 9,1 kb localisées sur le bras gauche du chromosome 12 (figure 1.15). En comparaison, le rDNA chez l'humain est regroupé sur les bras courts de cinq chromosomes différents (13, 14, 15, 21 et 22) [371].

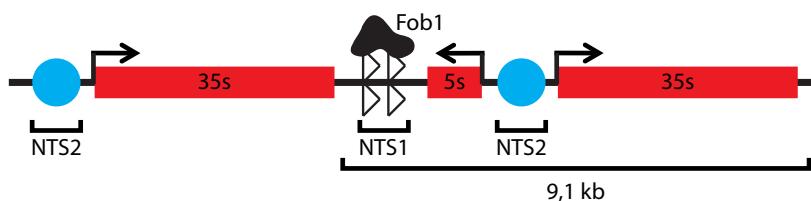


Figure 1.15

Représentation schématique du rDNA chez la levure *S. cerevisiae*.

Chaque unité du rDNA contient les gènes 35S et 5S transcrits dans des directions opposées ainsi que deux NTS «NonTranscribed Spacers». Le premier NTS (NTS1) contient la séquence d'une barrière de réPLICATION (RFB) [372-375]. La liaison de la protéine Fob1 est obligatoire pour que cette barrière de réPLICATION soit opérante [376, 377]. De plus, cette RFB est unidirectionnelle et permet l'arrêt d'environ 90% des fourches de réPLICATION arrivant du gène 5S [374, 375, 378, 379]. Cette barrière permet ainsi à la fourche de réPLICATION de se déplacer sur l'ADN dans le même sens que la machinerie de transcription pour éviter tout risque de collision [380]. Ce mécanisme d'arrêt de la fourche de réPLICATION est unique au loci du rDNA et est conservé de la levure jusqu'à l'homme [378, 381-384]. Le second NTS (NTS2) contient l'origine de réPLICATION et se situe entre les gènes 35S et 5S d'une même unité de 9,1 kb [375, 378].

En plus de son implication dans l'arrêt de la fourche de réPLICATION, la protéine Fob1 est essentielle au maintien du nombre de copies au locus du rDNA par recombinaison [385-387]. Cette seconde fonction de Fob1 est indépendante de sa fonction primaire. En effet, l'insertion de la séquence *HOT1* à l'extérieur du rDNA provoque la recombinaison à cet endroit même si la RFB n'est pas dans la bonne orientation [382]. De plus, la pause d'une fourche de réPLICATION à la RFB ne déclenche pas de réponse au niveau du point de contrôle, comme c'est le cas lors de l'effondrement d'une fourche de réPLICATION [388, 389]. Ce déclenchement du point de contrôle requiert la présence d'ADNsb, absent lors de la pause à une RFB [390, 391].

Finalement, une expérience avec une souche de *S. cerevisiae*, où deux RFB en direction opposées sont incorporer dans le chromosome 3 entre deux origines de réPLICATION, démontre que la pause de la fourche de réPLICATION et la reprise de la synthèse d'ADN sont indépendantes des kinases Tel1/ATM et Mec1/ATR ainsi que de Rad52 [388]. La reprise de la synthèse ne semble dépendre que de l'enlèvement de la RFB par la deuxième fourche de réPLICATION.

En ce qui concerne la pause d'une fourche de réPLICATION au niveau du rDNA chez *S. cerevisiae*, elle requiert deux protéines spécifiques : Tof1 et Csm3 [388, 392-395]. Ces deux protéines interagissent ensemble et avec l'hélicase MCM de la fourche de réPLICATION [396-400]. Ainsi, chez *S. cerevisiae* et *S. pombe*, l'absence de la protéine Tof1/Swi1 provoque l'apparition de foci au niveau du noyau cellulaire. Cependant, chez *S. cerevisiae*, la présence

de mutants du complexe Smc5-6 provoque un défaut de ségrégation du rDNA [177]. Dans ce cas particulier, la délétion des protéines de recombinaison n'a aucun impact sur le défaut de ségrégation du rDNA [271]. Le problème provient plutôt du fait que les cellules sont incapables de compléter la réPLICATION du rDNA avant l'entrée en mitose [271]. Ce phénotype peut être supprimé par l'inactivation des protéines Fob1 et Pol1, réduisant ainsi l'encombrement protéique sur le rDNA. Étonnamment, le point de contrôle n'est pas activé pour donner plus de temps à la réPLICATION, alors que les cellules sont aptes à le faire [271].

La fragmentation, ou la formation de contour irrégulier au niveau du nucléole, est un autre phénotype des mutants du complexe Smc5-6, mettant en évidence un second rôle du complexe Smc5-6 dans l'homéostasie du rDNA [129, 401]. Cette fonction prend forme lors de la création d'un DSB au rDNA puisque le complexe Smc5-6 est impliqué dans la réparation de ce dommage (figure 1.16) [272]. Lorsqu'un DSB survient au niveau du rDNA, sa réparation par HR est normalement initiée jusqu'au moment où RPA est substitué par Rad51. À ce moment, dans le nucléole, l'interaction entre RPA, Rad51 et Rad52 ne se forme pas. En fait, Rad52 est exclue du nucléole et cette exclusion est dépendante du complexe Smc5-6 [272]. Ainsi, le complexe Smc5-6 facilite le transport du DSB à l'extérieur du nucléole où la réparation prend place [272]. Chez les mutants du complexe Smc5-6, Rad52 peut pénétrer le nucléole pour initier le HR, ce qui entraîne une contraction ou une élongation du nombre de répétitions du rDNA et crée une instabilité génétique. L'exclusion de Rad52 est due à la sumoylation de cette dernière, sumoylation qui est indépendante de Nse2 [272]. Un mutant de Rad52 ayant perdu les sites de sumoylation peut entrer dans le

nucléole pour initier le HR [272]. Ce mécanisme d'exclusion de Rad52 semble être préservé chez les eucaryotes supérieurs [402].

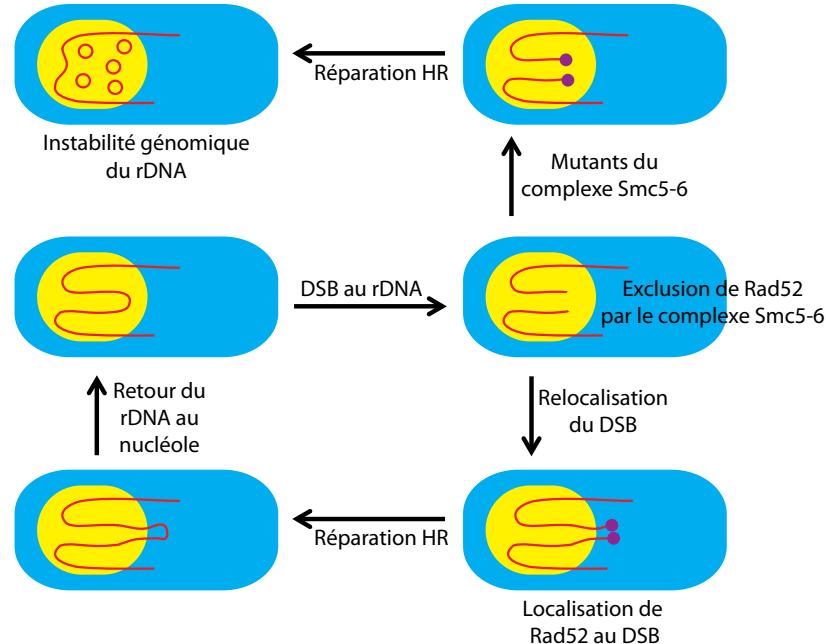


Figure 1.16

Représentation schématique de la réparation par HR du rDNA. La partie en bleu représente le noyau cellulaire alors que la partie en jaune représente le nucléole. Le rDNA se retrouve à l'intérieur du nucléole. Lorsqu'un DSB arrive au rDNA, il y a exclusion de Rad52 (billes mauves) par le complexe Smc5-6. Suite à la relocalisation du DSB à l'extérieur du nucléole, Rad52 peut se lier aux extrémités du DSB pour initier la réparation par HR. Après réparation par HR, le rDNA retourne dans le nucléole. S'il y a une mutation dans le complexe Smc5-6, Rad52 peut entrer dans le nucléole pour initier la réparation par HR. Due à la nature répétitive du rDNA, il peut y avoir formation de fragments circulaires. La formation de ces fragments va conduire à de l'instabilité génomique au niveau du rDNA.

Les télomères constituent une autre source importante d'ADN répétée [403]. Après chaque division cellulaire, les télomères raccourcissent en raison d'un problème de réPLICATION au niveau du brin indirect (orientation 3' vers 5'). Ce phénomène peut, à long terme, entraîner la sénescence cellulaire [404, 405]. La majorité des cellules cancéreuses

induisent la transcription d'une enzyme, la télomérase, pour permettre l'elongation de leurs télomères [406]. Les cellules cancéreuses incapables d'induire la transcription de la télomérase utiliseront un autre mécanisme pour allonger leurs télomères connu sous le nom de ALT («Alternative Lengthening of Telomeres») [407]. Ce mécanisme utilise le HR pour promouvoir l'elongation des télomères par leur recrutement au niveau des PML-NBs «ProMyelocytic Leukemia Nuclear Bodies» [408, 409]. Le complexe Smc5-6, quant à lui, est localisé au niveau des PML-NBs. La déplétion de l'un de ses membres entraîne une réduction de la recombinaison entre les télomères et leur raccourcissement [136]. Le mécanisme utilisé comprend une sumoylation de TRF1, TRF2, TIN2 et RAP1, qui font partie du complexe «Shelterin/telosome». Cette sumoylation, dépendante de Nse2, permet le recrutement des télomères aux PML-NBs en raison de la grande affinité entre les protéines du PML-NBs et la protéine SUMO [136, 410]. Les données actuelles ne permettent cependant pas de déterminer si le complexe Smc5-6 accomplit d'autres fonctions dans le processus d'elongation des télomères.

1.4) Hypothèses et objectifs de la thèse

Deux principaux mécanismes sont responsables de la liaison à l'ADN; le premier fait appel à une interaction physique entre l'ADN et la protéine, que ce soit séquence spécifique ou non (p.ex. les facteurs de transcription), et le second repose sur une interaction topologique entre l'ADN et la protéine. Ce second mécanisme est d'ailleurs utilisé par cohésine et condensine dans l'accomplissement de leurs fonctions biologiques [82, 411]. Ces deux complexes protéiques forment ainsi un anneau autour d'un ou plusieurs

fragments d'ADN (figure 1.17A). Ce mécanisme de liaison n'implique aucun lien physique entre l'ADN et l'anneau. Cependant, une contrainte physique est établie par cette interaction entre les deux protagonistes pour empêcher toute perte de proximité.

Le complexe Smc5-6 est impliqué dans la réparation de l'ADN par homologie de séquence et ce mécanisme est utilisé pour réparer l'insulte la plus grave faite au génome : le DSB. La création d'un DSB est accompagnée de la formation d'une brèche qui entraîne une discontinuité dans le fragment d'ADN rendant la liaison à l'ADN de façon topologique possible, mais peu probable (figure 1.17B) [412]. La présence de cette brèche retire toute contrainte physique entre l'anneau et l'ADN. Dès lors, l'anneau peut glisser à l'intérieur de la brèche et provoquer une perte de cohésion entre les chromatides-sœurs rendant la réparation de l'ADN par homologie de séquence inefficace.

Ces évidences convergent vers une importante question concernant le complexe Smc5-6 : Comment lie-t-il l'ADN lors de la réparation par homologie de séquence? Pour répondre à cette interrogation, l'étude biochimique de la liaison à l'ADN du complexe Smc5-6 fut entreprise, en débutant tout d'abord par l'étude de l'unité de base (Smc5 et Smc6). À cette fin, deux questions furent élaborées : Smc5 et Smc6 peuvent-ils lier l'ADN? Quelles sont les régions de Smc5 et Smc6 responsables de la liaison à l'ADN? La réponse à ces questions a pour but une meilleure compréhension de l'implication du complexe Smc5-6 dans la réparation d'un DSB de même que la création de nouveaux mutants avec

un défaut dans la liaison à l'ADN afin de faciliter l'étude du complexe Smc5-6 durant la réparation de l'ADN *in vivo*.

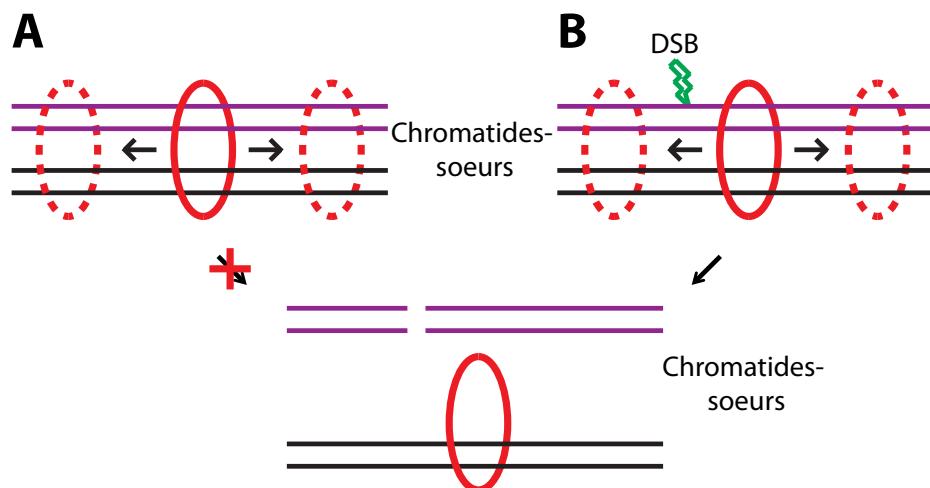


Figure 1.17

Liaison à l'ADN de manière topologique. A) L'anneau formé par un complexe SMC peut se déplacer sur l'ADN. B) Lorsqu'un DSB apparaît dans l'une des chromatides-soeurs, l'anneau formé par un complexe SMC peut se déplacer dans cette région. Comme il n'y a pas d'ancrage entre l'anneau et l'ADN, celui-ci peut glisser dans la brèche ce qui va mener à une perte de la cohésion entre les chromatides-soeurs.

2.0) Caractérisation de l'interaction entre Smc5 et l'ADN

Dynamic and selective DNA-binding activity of Smc5, a core component of the Smc5-Smc6 complex

Marc-André Roy, Nadeem Siddiqui, and Damien D'Amours*

Institute for Research in Immunology and Cancer
and Département de Pathologie et Biologie Cellulaire
Université de Montréal
P.O. Box 6128, Succursale Centre-Ville
Montréal, QC, H3C 3J7
CANADA

*Corresponding author

Key words: Smc5, structural maintenance of chromosomes, DNA-binding, ATPase, Smc5-6 complex.

2.1) Abstract

Members of the structural maintenance of chromosome (SMC) family of proteins are essential regulators of genomic stability. In particular, the conserved Smc5-6 complex is required for efficient DNA repair, checkpoint signaling, and DNA replication in all eukaryotes. Despite these important functions, the actual nature of the DNA substrates recognized by the Smc5-6 complex in chromosomes is currently unknown. Furthermore, how the core SMC components of the Smc5-6 complex use their ATPase-driven mechanochemical activities to act on chromosomes is not understood. Here, we address these issues by purifying and defining the DNA-binding activity of Smc5. We show that Smc5 binds strongly and specifically to single-stranded DNA (ssDNA). Remarkably, this DNA-binding activity is independent of Smc6 and is observed with the monomeric form of Smc5. We further show that Smc5 ATPase activity is essential for its functions *in vivo* and that ATP regulates the association of Smc5 with its substrates *in vitro*. Finally, we demonstrate that Smc5 is able to bind efficiently to oligonucleotides consistent in size with ssDNA intermediates produced during DNA replication and repair. Collectively, our data on the DNA-binding activities of Smc5 provide a compelling molecular basis for the role of the Smc5-6 complex in the DNA damage response.

2.2) Introduction

Members of the structural maintenance of chromosomes (SMC) family of proteins are evolutionarily conserved regulators of chromosome structure and integrity (reviewed in refs [1, 2]). These proteins are present in all domains of life and are essential for the execution of key cellular processes including chromosome condensation, sister-chromatid cohesion, and DNA repair. The critical importance of SMC proteins is illustrated by the fact that loss of any member of the SMC family leads to lethality in all organisms where this has been studied [1-4].

The founding member of the SMC family of proteins, Smc1, was initially characterized in the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae* [5]. Soon after its discovery, many additional SMC family members were identified in all domains of life and it is now well established that eukaryotic organisms contain at least six distinct SMC family members (Smc1-6; nematodes also have a 7th member) [1, 2]. One of the defining features of SMC proteins is their unique domain organization. The N- and C-terminal extremities –or head domains– of SMCs adopt a globular configuration and contain Walker A and Walker B/DA box nucleotide-binding motifs [5-7]. These motifs together with a signature motif confer ATPase activity to SMC proteins. Remarkably, the ATPase head domains are separated by two long α -helices that are interrupted by a central globular domain, the hinge domain [5]. As its name implies, the hinge domain allows the two α -helical regions of SMCs to fold back on each other in such a way as to form a long coiled-coil rod [7-9]. The formation of the coiled-coil rod leads to the association of the two globular head domains, thereby creating

a functional ATP-binding site by joining together the Walker A and B motifs of each head domain [7, 8]. In their mature folded state, individual SMC proteins are ~50-60 nm long rod-like molecules bearing one large (ATPase head) and one more modest (hinge domain) globular extremities [8].

Despite carrying all the sequence motifs necessary for ATP hydrolysis, individual SMC proteins require dimerization with other SMC proteins to become fully active ATPases *in vitro* [9-11]. Consistent with this, eukaryotic SMC proteins always work as hererodimers *in vivo* [12-15] and the association of two SMC proteins is mediated by the hinge domains of both partner molecules [8, 9]. The 6 eukaryotic SMCs associate in 3 major complexes; cohesin (Smc1 and 3), condensin (Smc2 and 4) and the Smc5-6 complex (Smc5 and 6) [1, 2]. Cohesin and condensin are the most extensively studied SMC complexes and, as their name implies, are required for chromosome cohesion and condensation, respectively [16-18]. In contrast, the specific molecular functions of the Smc5-6 complex are not understood in as much details as the functions of other SMC complexes [3, 4]. Analysis of cells deficient in Smc5-6 complex activity indicates that this complex is involved in multiple aspects of the maintenance of genome integrity, including DNA repair, checkpoint signaling, DNA replication, and telomere length maintenance (reviewed in refs [3, 4]). Consistent with these important cellular functions, complete inactivation of Smc5-6 leads to lethality in most eukaryotes where it has been tested [3, 4, 19].

A central issue regarding the mode of action of the Smc5-6 complex is whether a single core molecular activity of the complex is responsible for its involvement in various aspects of the DNA damage response, or whether multiple different molecular functions explain its involvement in multiple cellular functions. Part of the reason why it is difficult to answer this question is because the key biochemical activities of the Smc5-6 complex are largely unknown at present. Other SMCs are known to mediate their cellular function through a mechanochemical cycle utilizing the energy of ATP hydrolysis to alter the physical organization and/or topology of chromosomal DNA [2]. This mode of action may also apply for the Smc5-6 complex. However, the fact that the DNA-binding properties of this complex are currently unknown makes it difficult to understand how the mechanochemical activities of Smc5-6 may promote chromosome integrity in response to DNA damage. Moreover, it is unclear at present whether the ATPase activity of the Smc5-6 complex [15] would be required for DNA-binding or modification of DNA substrates by the complex.

These fundamental questions remain unanswered largely because the core components of the Smc5-6 complex have never been successfully purified in their native state. This prompted us to initiate an extensive biochemical characterization of the Smc5-6 complex. We report herein the first successful purification and biochemical characterization of full-length Smc5, a core component of the Smc5-6 complex. Our study reveals unique DNA-binding properties associated with Smc5 and implicates ssDNA intermediates as the key physiological targets of the Smc5-6 complex in the DNA damage response.

2.3) Materials and Methods

Yeast strains and molecular biology

All yeast strains used in this study are derivatives of W303. Standard procedures were used for yeast culture, genetics, and molecular biology [23]. For protein overexpression, Smc5 coding sequence was fused at its C-terminus to a tandem affinity purification tag (3 x StreptagII tag and 9 x His) and subcloned as a BamHI-XmaI fragment downstream of the *GAL1* promoter in a 2u *URA3 leu2-d*-derived plasmid (p634).

Protein purification

Proteins were overexpressed in strain D1074 [23] transformed with plasmid p634. Protein expression was induced for 4 hrs with galactose (2% final) in 6 liters culture. Smc5-overexpressing cells were resuspended in 25 mL of lysis buffer (100 mM KPO₄ pH 8.0, 50 mM Tris-HCl pH 8.0, 50 mM NaCl, 5% glycerol supplemented with phosphatase inhibitors and protease inhibitors cocktail set IV [EMD]) and lysed as previously described [23]. After lysis, salt was adjusted to 1M NaCl and glycerol was adjusted to 5% and the lysate was centrifuged at 16,500g for 15 min at 4°C. Soluble proteins were taken and the pH of the lysate was adjusted to 8.0. The lysate was then diluted twofold with NS buffer (25 mM KPO₄ pH 8.0, 750 mM NaCl, 5% glycerol, 0.7% Tween 20) and incubated with Ni-NTA agarose resin (Qiagen) for 1h. The resin was washed with 10 column volumes (CVs) of NS buffer supplemented with 45 mM imidazole and eluted with 3 CVs of NS buffer supplemented with 500 mM imidazole. The eluate was then incubated with Strep-Tactin resin (Qiagen) for 1h, washed with 10 CVs of NS buffer and eluted with 5 CVs of NS buffer supplemented with

10mM of desthiobiotin. The eluate was concentrated by ultrafiltration using Amicon Ultra filtration units (10K NMWL; Millipore) and further purified by size exclusion chromatography on a Superose 6 10/300 column (GE Healthcare) in S6 buffer (25 mM KPO₄ pH 8.0, 750 mM NaCl, 15% glycerol, 0.2% Tween 20, 1 mM EDTA and 2 mM 2-mercaptoethanol [BME]). Fractions containing Smc5 corresponded to the first major A₂₈₀ peak eluting from the sizing column. The second A₂₈₀ peak eluting from the column is not associated with any specific protein and has been previously observed in the purification of other 9xHIS-3xStreptagII-tagged proteins expressed in yeast [23]. Final fractions containing Smc5 were concentrated to ~2 mg/mL with Amicon Ultra filtration units (10K NMWL; Millipore), frozen on dry ice and stored at -80°C. Smc5 was purified to ≥95% homogeneity by this procedure and was stable for at least 1 month at -80°C. The typical yield of the purification was ~0.25 mg Smc5 per liter of culture.

Analytical ultracentrifugation

Sedimentation velocity experiments were performed on a Beckman XL-I analytical ultracentrifuge (Beckman Coulter), using the UV-VIS optics detection system, an An60ti rotor, and 12mm double sector centerpieces [25]. Experiments were performed using different concentrations, 580-700 µg/mL (4.36-5.26 µM), of pure Smc5 protein yielding an absorbance of 0.30-0.46 at 280nm. The reference and sample sectors of the ultracentrifuge cell were filled with 400 µl of modified S6 buffer containing 5% (instead of 15%) glycerol and 390 µl of protein, respectively. Sedimentation velocity runs were carried out at either 25,000 or 40,000 rpm, with absorbance scans monitored at 280 nm over a total spin time of

6-8 h at 20°C. Sample and rotor were at thermal equilibrium prior to starting the run. The radial increment was 0.003 cm and radial absorbance scans were collected between 5.8 and 7.3 cm. The molecular weight of Smc5-STH (132981.2 Da), partial specific volume of the protein (0.7360 ml/g), buffer viscosity ($\eta = 0.0012089$ poise), and buffer density (1.0439 g/mL) were calculated using the public domain software SEDNTERP (<http://www.rasmb.bbri.org/>) [50]. Sedimentation velocity data were analyzed using the computer program SEDFIT89 [25]. Sedimentation profiles were obtained by fitting the absorbance data to the continuous $c(S)$ or $c(M)$ model allowing for estimates of the sedimentation coefficient and molecular weight [25].

DNA binding experiments

Linear double-stranded (ds) DNA templates were prepared by EcoRI digestion of circular plasmids (pBluescript II KS+) or by annealing of single-stranded (ss) DNA oligonucleotides, as previously published [51], with some modifications. Specifically, an equimolar mixture of complementary ss oligonucleotides was dissolved in TE buffer (10 mM Tris-HCl pH 7.5, 1 mM EDTA) and denatured by heating to 95°C for 5 min. The mixture was then allowed to slowly cool down to room temperature over a period of 2 h. The sequence of the oligonucleotide used are: 1251: 5'-FAM-CCAGTGAATTGTAAT-3'; 1253: 5'-ATTACAATTCAC TGG-3'; 1208: 5'-FAM-CCAGTGAATTGTAATACGACTCACTATAGG-3'; 1236: 5'-CCTATAGTGAG TCGTATTACAATTCACTGG-3'; 1252: 5'-FAM-CCAGTGAATTGTAATACGACTCACTATAGGGCG AATTGGAGCTCC-3'; 1254: 5'- GGAGCTCCAATTGCCCTATAGTGAGTCGTATTACAATTCACT

GG-3'; 1235: 5'-FAMCCAGTGAATTGTAATACGACTCACTATAGGGCGAATTGGAGCTCCACCGC
GGTGGCGGCC-3'; 1237: 5'-GGCCGCCACCGCGGTGGAGCTCCAATTGCCCTATAGTGAGTCGT
ATTACAATTCACTGG-3'. ssDNA templates (Φ X174 virion DNA, New England Biolabs; 6-carboxyfluorescein (FAM)-labelled oligonucleotides, Integrated DNA Technologies) were used in DNA-binding reactions as provided by suppliers. For DNA-binding experiments, reaction mixtures contained 10 mM Hepes pH 7.5, 50 mM NaCl, 7 mM MgCl₂, 2 mM BME, DNA substrates (50 ng of dsDNA, or 100 ng of ssDNA, or 7.5 pmol ss/ds oligonucleotides), and various concentrations of Smc5 (range 1.5 to 120 nM; see figure legends for Smc5-to-DNA molar ratios). After incubation at 30°C for 30 min, the reactions were terminated by addition of an equal volume of 1.6% low melting point (LMP) agarose containing loading buffer (0.6% glycerol, 0.005% bromophenol blue, 0.005% xylene cyanol final concentrations). The mixture was loaded on TAE-agarose gels and the DNA was resolved by electrophoresis at 3V/cm for 16h at 4°C (plasmids) or at 4V/cm for 4h at 4°C (oligonucleotides). The addition of LMP agarose in the wells of the gels is essential for accurate quantification of Smc5-DNA complexes since those complexes would otherwise be washed out of the wells of the gels during post-electrophoresis manipulations (*i.e.*, staining and visualization). We noticed that this procedure traps a very small fraction of circular plasmids in the wells in the absence of Smc5. DNA bands were visualized after staining the gels with SYBR Green I (dsDNA; Molecular Probes) or SYBR Gold (ssDNA; Molecular Probes) [28]. Oligonucleotides were visualized after electrophoresis by virtue of their FAM label [30]. In all cases, DNA bands were visualized using FLA-5000 fluorescence imaging system (Fujifilm Life Science). Quantification of DNA released from the wells of the

gel in the competition experiments was performed using MultiGauge 3.0 software (Fujifilm Life Science). Curve fitting, determination of affinity constants and Hill coefficients were performed using GraphPad Prism 5 (GraphPad Software Inc). All DNA-binding experiments were performed in triplicates.

ATPase assay

ATPase assay were performed as previously published with minors modifications [10, 29]. Reaction mixture contained 10 mM HEPES pH 7.5, 50 mM NaCl, 1 mM MgCl₂, 2 mM BME, 150 ng of dsDNA (linearized pBluescript), 1 mM ATP, 1 µCi of (g-³²P)ATP, 100 µg/mL of BSA, 5% glycerol and 0.9 µM of Smc5. The mixture was incubated at 30°C for 1h and the reaction products were subsequently separated by thin layer chromatography. Radiolabeled inorganic phosphate and ATP were detected using a FLA-5000 imaging system (Fujifilm Life Science).

DNA pelleting assay

DNA pelleting assays were performed as previously published with minors modifications [29]. Reaction mixtures contained 10 mM Hepes pH 7.5, 50 mM NaCl, 7 mM MgCl₂, 2 mM BME, and 0.2 µM of Smc5. DNA substrates used in pelleting assays were 100 ng of ΦX174 virion ssDNA, 112 ng 45-mer ssDNA oligonucleotide, or 150 ng 60-mer ssDNA oligonucleotide. The mixture was also supplemented with 1 mM ATP, 1 mM ATPyS, or no ATP, as indicated. All buffers were made fresh before the experiments. The mixture was incubated at 30°C for 30 min before being centrifuged at 16,000g for 15 min. Pellets and

soluble fractions were then loaded on a SDS-polyacrylamide gel and resolved by electrophoresis. The fractions containing Smc5 were visualized by staining the gels with coomassie blue (Bio-Rad).

2.4) Results

A novel system to purify Smc5

Full-length Smc5 has not been purified in quantities sufficient for extensive biochemical characterization in any organisms so far. We wanted to develop an efficient overexpression system to purify Smc5 from the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. This is necessary because endogenous Smc5 is present at less than 900 copies per cell in this organism [20], which is not abundant enough to allow convenient purification. To address this, we constructed a yeast multicopy plasmid that overexpresses Smc5 under the control of the galactose-inducible *GAL1* promoter. Smc5 was fused at its carboxy terminus with a tandem 3xStreptag II–9xHis (STH) affinity tag to facilitate purification.

Before performing large-scale purification, we wanted to determine whether the STH tag on Smc5 affected its functionality. To this end, we constructed yeast strains carrying *SMC5* gene fused at its 3' end to the sequence encoding the STH affinity tag. The tag was integrated at the endogenous *SMC5* locus, which means these cells express Smc5-STH as the sole version of this protein. Two independent yeast strains carrying the STH-tagged version of Smc5 were then tested for sensitivity to the DNA damaging agent methyl methanesulfonate (MMS) and for their ability to grow at 37°C. As can be seen in Figure 1A,

yeast strains carrying wild-type *SMC5* or *SMC5-STH* fusion behaved identically under all growth conditions. In contrast, a strain carrying the conditional mutation *smc5-6* [21] was unable to grow at high temperatures or in the presence MMS (Fig. 1A). Since *SMC5* is required for both viability and resistance to DNA damage, we can infer from these results that fusing the STH tag to Smc5 does not adversely affect its functionality.

Purification of Smc5

We next sought to purify Smc5 to homogeneity. To achieve this, STH-tagged Smc5 (hereafter referred to as Smc5) was overexpressed in yeast from a multicopy plasmid containing an inducible *GAL1* promoter. Exponentially-growing cells were induced to express Smc5 by addition of galactose in the growth medium. Remarkably, Smc5 was overexpressed to very high levels using this system, as evidenced by the emergence of a visible band at ~130 kDa in the total lysate after 4 h of induction (compare before and after induction in Fig. 1B). Smc5 was purified from whole cell lysates by affinity chromatography on nickel-chelate and Streptactin-conjugated resins followed by size exclusion chromatography on Superose 6 column. As can be seen in Figure 1B, Smc5 was purified to high concentration and near ($\geq 95\%$) homogeneity by this approach.

Interestingly, Smc5 eluted from the Superose 6 column as a single peak corresponding to a molecular mass of approximately 440 kDa when compared with globular mass standards (Fig. 1B). This apparent mass is much larger than the calculated molecular weight of a Smc5 monomer (132.98 kDa for the STH fusion). However, this result

is not unexpected since all SMC proteins studied so far show an elution behavior typical of larger proteins during size exclusion chromatography [12, 22, 23]. This is likely due to the highly elongated shape of individual SMC molecules [8] and the fact that size exclusion chromatography is sensitive to the shape of macromolecules [24]. Nevertheless, an alternative explanation for this result may be that Smc5 dimerizes or oligomerizes in solution. This possibility prompted us to further characterize Smc5 by sedimentation velocity analytical ultracentrifugation (SV-AUC). This technique allows one to determine the number of species present in a sample, the sedimentation coefficient of a protein, as well as its molecular weight and shape [25]. Interestingly, the presence of a single peak in the continuous sedimentation distribution profile of Smc5 indicates that the protein behaves as a single species in the sample (Fig. 2). We calculated a sedimentation coefficient of 2.9 ± 0.1 S for Smc5 in this experiment and the derived differential molar mass distribution, $c(M)$, for this species of Smc5 corresponds to a molecular weight of 123 ± 9 kDa. This experimental figure is consistent with the actual calculated molecular weight for the fusion protein (132.98 kDa). Moreover, this indicates that the single species observed in SV-AUC is actually a monomer. The sedimentation velocity experiments also indicated that Smc5 adopts a highly elongated shape in solution, with a frictional ratio (f/f_0) of 2.22, as expected for a monomeric SMC protein [8]. Collectively, these results indicate that we have efficiently purified Smc5 from yeast lysates and that the purified protein behaves as a monomer of elongated shape.

Affinity and specificity of Smc5 binding to DNA

SMC proteins are key regulators of genome integrity and, as such, they need to interact with DNA to mediate their functions [2]. Although members of the Smc5-6 complex are known to interact with many chromosomal loci in live cells, [21, 26] the precise DNA-binding properties of the complex are not known at present. We thus decided to conduct a series of electrophoretic mobility shift assay (EMSA) experiments to determine if purified Smc5 can bind to various types of DNA *in vitro*. To this end, we exposed increasing concentrations of Smc5 to a set concentration of DNA and resolved the resulting complexes by electrophoresis on agarose gels. Three types of DNA were used in the binding reactions with Smc5: 1) linear dsDNA plasmid, 2) circular dsDNA plasmid, and 3) circular ssDNA plasmid. As can be seen in Figure 3A, binding of Smc5 to DNA resulted in formation of complexes that failed to migrate out of the wells of the gel during electrophoresis. These Smc5-DNA complexes were formed in a Smc5 concentration-dependent manner irrespective of the types of DNA tested (Fig. 3A). However, comparing the molecular ratios of Smc5-to-DNA required to saturate DNA-binding strongly suggests that Smc5 has a higher affinity for ssDNA than for dsDNA (Fig. 3A, compare lanes 4, 9 and 15). Specifically, whereas Smc5 could fully shift ssDNA to the top of the gel at a Smc5-to-DNA molar ratio of 25:1, more than twice as much Smc5 (*i.e.*, 58:1) was required to achieve the same with either linear or circular dsDNA (Fig. 3A). Interestingly, the absence of difference in the association of Smc5 to linear or circular dsDNA (Fig. 3A) suggests that Smc5 can interact with nucleic acids independently of DNA ends or substrate supercoiling.

To better define the relative affinity of Smc5 for various forms of DNA, we incubated ssDNA and dsDNA with an extended range of concentrations of Smc5 in EMSA experiments. As can be seen in Figure 3B, the binding curves obtained with ssDNA and dsDNA substrates are significantly different. In particular, the binding constant of Smc5 for the ssDNA substrate is more than two-fold lower than its binding constant for the dsDNA substrate (*i.e.*, 22 ± 3 nM vs 48 ± 3 nM; Fig. 3B). These values compare well with the binding constants displayed by other DNA repair proteins for their substrates [27]. Interestingly, analysis of DNA mobility shift titrations using the Hill binding equation indicates that the association of Smc5 to dsDNA is clearly cooperative (Hill coefficient of 3.2 ± 0.7), whereas its association to ssDNA shows little-to-no evidence of cooperativity (Hill coefficient of 1.7 ± 0.4). Together, these observations indicate that the affinity and mode of interaction between Smc5 and DNA are strongly influenced by the nature of the DNA substrate.

We next asked if ssDNA can displace dsDNA when bound to Smc5. To this end, we performed competition experiments where we first incubated Smc5 with dsDNA for 15 minutes to allow the formation of complexes and then added increasing concentrations of ssDNA (Fig. 4A). The Smc5-dsDNA complexes were subsequently separated on gel and visualized with SYBR Green I (note that SYBR Green I efficiently stains dsDNA but not ssDNA [28]; see lanes 1 and 2 in Fig. 4A). As expected, whereas Smc5 fully shifts dsDNA to the wells of the gel under our conditions, introducing increasing concentrations of ssDNA in the binding reaction progressively displaced dsDNA from Smc5 (Fig. 4A-B; lanes 5-9). A low molar excess of ssDNA over dsDNA (~2-3 fold) was needed to efficiently compete dsDNA

away from Smc5 (Fig. 4A-B; lanes 7-9). Collectively, these results indicate that ssDNA can compete the dsDNA-Smc5 interaction. However, the modest ability of ssDNA to act as a competitor also suggests that the interaction between Smc5 and dsDNA is relatively stable once it has been established. The stable nature of the interaction between Smc5 and DNA can also be inferred from the fact that it is maintained during the 16 h of electrophoresis required to perform the EMSA experiments (Figs. 3-4).

The previous results prompted us to investigate the strength of the interaction between Smc5 and DNA. The ability of specific biochemical interactions to occur at salt concentrations of ~150 mM is often considered a minimal condition to consider such biochemical phenomenon relevant to the situation in live cells. To test this, Smc5-DNA complexes were incubated with increasing concentrations of salt and the ability of Smc5 and DNA to remain in complex under these conditions was evaluated by EMSA. As can be seen in Figure 4C, the interaction of Smc5 with linear dsDNA is stable up to ~100 mM NaCl. However, salt concentrations of 125 mM and above effectively eliminated the ability of Smc5 to maintain its interaction with dsDNA, as evidenced by the release of free DNA from the wells of the gel under these conditions (Fig. 4C; lanes 6-9). In striking contrast, the binding of Smc5 to ssDNA was very stable at all concentrations of salt tested (up to 200 mM NaCl; Fig. 4D). Even though a small part of the ssDNA was released from the wells of the gel at salt concentrations ranging from 150 to 200 mM, no ssDNA migrates back as a discrete band at the position expected for free plasmid under these conditions (Fig. 4B; lanes 6-8). Instead, a longer exposure of the gel revealed a faint continuous "smear" of

ssDNA signal under the wells. These results indicate that high salt concentrations can specifically release some of the supramolecular Smc5-ssDNA assemblies trapped in the wells of the gel. Nevertheless, the basic Smc5-ssDNA complex is not disrupted by high concentrations of salt, as evidenced by the inability of salt to release free ssDNA from Smc5 complexes (Fig. 4D; lanes 6-8). We conclude from these experiments that Smc5 binds ssDNA tightly at physiological concentrations of salt, whereas the interaction between Smc5 and dsDNA is sensitive to relatively low concentrations of salts.

Essential roles of the ATPase activity of Smc5

As a member of the SMC family of protein, Smc5 is predicted to hydrolyze ATP when performing its functions *in vivo* [2]. At least in fission yeast, a partially-purified Smc5-6 complex has been shown to be an active DNA-stimulated ATPase [15]. Interestingly, even though individual SMCs carry all the functions necessary for ATP hydrolysis, they are known to have very low or undetectable levels of ATPase activity in monomeric form [9-11]. We thus wanted to investigate whether purified Smc5 has intrinsic ATPase activity. To this end, we conducted Smc5 ATPase assays with radiolabeled ATP in the presence and absence of DNA. The ratio of inorganic phosphate produced by Smc5 relative to the ATP remaining after the reaction was determined following separation of both species by thin layer chromatography [9]. Monomeric Smc5 was able to hydrolyze ATP in the presence of dsDNA, albeit to a very low rate of $0,0019 \pm 0,0005$ mol of ATP per mol of Smc5 per sec. This ATPase activity is low but comparable to the rate detected with Smc2 or Smc3 ATPase alone [10, 11]. The presence or absence of DNA in the ATPase reaction did not seem to

affect the rate of ATP hydrolysis by monomeric Smc5 (data not shown). This weak ATPase activity prompted us to ask whether ATP hydrolysis was important for the functions of the Smc5-6 complex *in vivo*. Interestingly, yeast strains carrying Smc5 mutations that are predicted to slow down (E1015Q) or completely abolish ATP hydrolysis (D1014A) are inviable (Supplemental Fig. 1A-B). This result is similar to the lethality observed in fission yeast strains carrying comparable mutations in Rad18/Smc6 [15]. Taken together, these results reveal that the weak intrinsic ATPase activity of monomeric Smc5 is in fact essential for its functions in live cells.

The previous experiments suggested that binding and/or hydrolysis of ATP might be important for the DNA-binding activity of Smc5. We thus wanted to investigate whether ATP has an impact on Smc5 binding to DNA. To test this, EMSA experiments were conducted in the presence or absence of 1 mM ATP. Remarkably, Figure 5 (panels A and B) shows that the presence of ATP does not detectably alter the binding properties of Smc5 on dsDNA or ssDNA substrates. We reasoned that the electrophoresis conditions in the EMSA assay might limit our ability to visualize the impact of ATP on Smc5 DNA-binding activity (*e.g.*, magnesium will be chelated by EDTA in the running buffer). This possibility prompted us to investigate the role of ATP using a solution-based DNA-binding assay. Hirano and collaborators showed previously that *Bacillus subtilis* SMC (BsSMC) dimer can form supramolecular complexes with DNA (*i.e.*, large nucleoprotein aggregates) in an ATP-dependent manner [29]. Importantly, these supramolecular complexes can be distinguished from the (presumably smaller) ATP-insensitive BsSMC-DNA complexes by

their ability to be pelleted by centrifugation [29]. We thus tested whether Smc5 shows this behavior by incubating it with ssDNA plasmid for 30 min and then centrifugating the resulting complexes at 16,000g for 15 min. As expected, most of Smc5 remained in the supernatant fraction when centrifuged in the absence of DNA (Fig. 5C; lanes 1-3). In contrast, we observed that Smc5 is mostly recovered in the pellet fraction when incubated with ssDNA in the absence of ATP (Fig. 5C; lane 4). Surprisingly, addition of 1 mM ATP in the binding reaction reversed the interaction of Smc5 with DNA. Specifically, more than 50% of Smc5 is found in the supernatant fraction when ATP is included in the binding reaction, whereas most Smc5 pellets with DNA in the absence of ATP (Fig. 5C; compare lanes 4 and 5). The ability of Smc5 to be released from precipitable complexes with DNA was prevented by substituting ATP with ATPyS (Fig. 5C; compare lanes 5 and 6). This result indicates that Smc5 must hydrolyze ATP in order to be released from its interaction with DNA. Taken together, these results strongly suggest that Smc5 can bind DNA efficiently in the absence of ATP (Fig. 5A,B), but that ATP can facilitate the release of Smc5 from precipitable complexes with DNA (Fig. 5C).

Smc5 binds efficiently to short ssDNA oligomers

We next wanted to determine the minimal length of DNA required to associate with Smc5. To address this question, we performed EMSA experiments with fluorescent oligonucleotides of various lengths (15, 30, 45 and 60 nt or bp) [30]. Remarkably, Smc5 was able to interact with 60-mer ssDNA oligonucleotide as efficiently as with large plasmids (compare Figs. 3 and 6A). Reducing the length of the ssDNA to 15 or 30 nt effectively

eliminated binding to Smc5 (Fig. 6A; lanes 1-10). Interestingly, Smc5 formed a complex with a 45-mer ssDNA oligonucleotide at a 1:1 molar ratio (Fig. 6A; lane 14). In contrast, the same length dsDNA oligonucleotide bound very poorly to Smc5 (Fig. 6B; lane 14). Even with the 60-mer dsDNA oligonucleotide, a two-fold molar excess of Smc5 was required to partially shift the DNA to the well of the gel (Fig. 6B; lane 20). Importantly, the difference in the binding specificity seen between the ss and dsDNA oligonucleotides was not due to sequence differences because the dsDNA 60-mer was created by annealing a heat-denatured version of the ssDNA 60-mer used in Figure 6A together with an unlabelled complementary oligonucleotide. Furthermore, we show that the heat-denaturation step required to anneal the two ssDNA 60-mers into a single dsDNA 60-mer does not influence the ability of the ssDNA oligonucleotide to bind Smc5 (Fig. 6B; compare the heat-denatured ssDNA 60-mer in lane 21 with an untreated ssDNA 60-mer in lane 22).

Finally, we tested whether small ssDNA oligonucleotides also have the ability to form precipitable complexes with Smc5 in "pull down" experiments. Remarkably, most of Smc5 was recovered in the pellet fraction after centrifugation in the presence of a 60-mer ssDNA oligonucleotide (Fig. 5D; compare lanes 1 and 3). Similar, though more modest precipitation, was obtained in the presence of a 45-mer ssDNA oligonucleotide (Fig. 5D; lane 2). Since a limited amount of Smc5 can bind to each oligonucleotide, our results suggest that the ability of ssDNA to alter the precipitability of Smc5 may not depend on the formation of large aggregates. Taken together, our results with oligonucleotides strengthen the notion that Smc5 binds ssDNA substrates more effectively than dsDNA

substrates and reveal that Smc5 can efficiently associate with ssDNA regions as short as ~40-50 nt.

2.5) Discussion

We report in this study the first extensive biochemical characterization of wild-type Smc5. Although much is known about the network of interactions linking Smc5 to the other components of the Smc5-6 complex [31-34], very little is known about the biochemical and enzymatic properties of this protein alone or as part of its native complex. In fact, eukaryotic SMC family members are often studied as part of larger complexes or as truncated variants because they are typically difficult to purify as monomers at their native length. This limitation prompted us to develop a novel overexpression system that would allow us to purify Smc5 in significant quantities. Our ability to successfully purify monomeric Smc5 enabled us to address a number of fundamental questions regarding the contribution of this protein to the larger Smc5-6 complex.

Smc5 binding to ssDNA: Comparisons with other SMCs

We show herein that Smc5 has strong and selective DNA-binding properties. Although capable of binding to dsDNA to a significant extent, Smc5 shows a clear preference for binding to ssDNA substrates under several conditions. The specificity of Smc5 towards particular DNA substrates has both similarities and clear differences with that of other SMC proteins. For instance, like Smc5, BsSMC and *Escherichia coli* MukB (EcMukB) dimers have been shown to bind ssDNA with higher affinity than dsDNA [29, 35].

Likewise, the purified hinge domains of human Smc2-4 bind preferentially to ssDNA relative to dsDNA [30]. In contrast, the condensin holocomplex or its native Smc2-4 subunits bind substantively to dsDNA [10, 36-39], a type of DNA for which the isolated hinge domain show very little affinity [30]. Moreover, the purified ATPase head of a bacterial SMC as well as those of eukaryotic Smc1, Smc2, Smc3, and Rad50 have all been shown to mediate binding to dsDNA [40-43]. Taken together, these results suggest that the overall DNA-binding activity of SMC proteins may be imparted by multiple distinct regions on these molecules. This point highlights the benefit of examining SMC proteins in their native full-length state in order to obtain an integrative view of their DNA-binding properties.

Smc5 binding to ssDNA: Mechanistic implications

Our study revealed an unexpected key role for ATP in the regulation of the DNA-binding activity of Smc5. Indeed, even though the presence of ATP does not affect the basic DNA-binding activity of Smc5 measured in EMSA experiments, we observed that the presence of ATP reduced the ability of Smc5 to form nucleoprotein complexes that can be pelleted in "pull down" experiments. In contrast, ATP is absolutely required for BsSMC to form precipitable higher-order complexes with DNA [29]. The difference between Smc5 and BsSMC in this regard could be due to the fact that bacterial SMCs need to act as homodimers, not heterodimers, and this may impose different regulatory mechanisms on this family of SMCs. Our experiments with non-hydrolyzable ATP γ S also showed that the release of Smc5 from nucleoprotein complexes requires ATP hydrolysis. This activity is likely

to be important *in vivo* since preventing Smc5 release from its DNA substrates would prevent effective ssDNA processing in cells. Consistent with this, our genetic analysis of Smc5 mutants incapable of binding or hydrolyzing ATP revealed that this function is essential for viability in yeast.

Another important mechanistic insight from our study comes from the observation that Smc5 is able to bind DNA as a monomer. This is surprising in light of the fact that it has been proposed that dimerization of BsSMC is essential for its interaction with DNA [2, 9]. However, the possibility that Smc5 acts as a homodimer in our experiment is remote. Indeed, even at a concentration in excess of 200-fold above the binding constant of Smc5 for ssDNA (5.36 mM vs 22 nM), no evidence of Smc5 dimerization was observed in AUC experiments. Although the overall DNA-binding properties of the Smc5-6 complex will reflect the contribution of several of its components *in vivo*, our result indicate that Smc5 is likely to play a key role in the recruitment of the holoenzyme to its substrate in live cells. Interestingly, it was recently observed that the interaction between Smc5 and Smc6 was lost specifically during mitosis in human cells [44]. This observation raises the intriguing possibility that Smc5 might function independently of Smc6 –and likely other components of the Smc5-6 holocomplex– during M phase. If this were the case, the intrinsic DNA-binding specificity of Smc5 described herein would likely be the major (or sole) determinant of its interaction with chromosomes *in vivo*.

Physiological functions of the Smc5-6 complex

The DNA-binding properties of Smc5 described above are consistent with the multiple roles proposed for the Smc5-6 complex in the maintenance of genomic integrity. In particular, ssDNA is an important intermediate in DNA repair by homologous recombination, DNA replication and telomere length maintenance [45-47]. The fact that Smc5 binds to short regions of ssDNA at physiological concentrations of salt strongly suggests that this structure is a physiological target of the Smc5-6 complex *in vivo*. Our results provide direct evidence for the hypothesis of Sjogren and collaborators that the Smc5-6 complex might be active on single-stranded substrates arising during DNA replication [26]. The existence of ssDNA intermediates during DNA replication [46], checkpoint signaling [48, 49], DNA repair [47], and at telomeres [45] is well established. Interestingly, our determination of the minimal size of ssDNA required for Smc5 binding – 40 to 50 nt– is much smaller than the size of ssDNA regions detected at replication forks and at sites of DNA damage [46, 47]. This suggests that the formation of ssDNA during these processes can accommodate the binding of a significant numbers of Smc5-6 complexes at each site, as expected from genome-wide localization data [26]. It will be interesting to determine in the future whether the mere presence of ssDNA in the genome is sufficient to target Smc5 to damaged and/or replicating chromatin or whether this recruitment requires additional chromatin loading activity.

2.6) Acknowledgements

We would like to Alain Verreault, Julie St-Pierre, Martin Audet, and members of the D'Amours laboratory for their comments on the manuscript. The authors would like to acknowledge the contribution of the Biophysical Platform at the Institute for Research in Immunology and Cancer (IRIC) for the analytical ultracentrifugation experiments. IRIC receives infrastructure support funds from the Fonds de la Recherche en Santé du Québec (FRSQ) and from Canadian Institutes for Health Research (CIHR) multi-resource grant. This study was supported by a grant from the CIHR to D.D. [MOP-82912]. D.D. is recipient of a Tier II Canada Research Chair in Cell Cycle Regulation and Genomic Integrity.

2.7) References

1. Losada, A. and T. Hirano, *Dynamic molecular linkers of the genome: the first decade of SMC proteins*. Genes & development, 2005. **19**(11): p. 1269-87.
2. Hirano, T., *At the heart of the chromosome: SMC proteins in action*. Nature reviews. Molecular cell biology, 2006. **7**(5): p. 311-22.
3. Strom, L. and C. Sjogren, *Chromosome segregation and double-strand break repair - a complex connection*. Current opinion cell biology, 2007. **19**(3): p. 344-9.
4. De Piccoli, G., J. Torres-Rosell, and L. Aragon, *The unnamed complex: what do we know about Smc5-Smc6?* Chromosome research, 2009. **17**(2): p. 251-63.
5. Strunnikov, A.V., V.L. Larionov, and D. Koshland, *SMC1: an essential yeast gene encoding a putative head-rod-tail protein is required for nuclear division and defines a new ubiquitous protein family*. Journal of Cell Biology, 1993. **123**(6 Pt 2): p. 1635-48.
6. Walker, J.E., et al., *Distantly related sequences in the alpha- and beta-subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold*. EMBO journal, 1982. **1**(8): p. 945-51.
7. Saitoh, N., et al., *Scll: an abundant chromosome scaffold protein is a member of a family of putative ATPases with an unusual predicted tertiary structure*. Journal of cell biology, 1994. **127**(2): p. 303-18.
8. Hirano, M., et al., *Bimodal activation of SMC ATPase by intra- and inter-molecular interactions*. EMBO journal, 2001. **20**(12): p. 3238-50.
9. Hirano, M. and T. Hirano, *Hinge-mediated dimerization of SMC protein is essential for its dynamic interaction with DNA*. EMBO journal, 2002. **21**(21): p. 5733-44.
10. Stray, J.E. and J.E. Lindsley, *Biochemical analysis of the yeast condensin Smc2/4 complex: an ATPase that promotes knotting of circular DNA*. Journal of Biological Chemistry, 2003. **278**(28): p. 26238-48.
11. Arumugam, P., et al., *Cohesin's ATPase activity is stimulated by the C-terminal Winged-Helix domain of its kleisin subunit*. Current biology, 2006. **16**(20): p. 1998-2008.
12. Hirano, T. and T.J. Mitchison, *A heterodimeric coiled-coil protein required for mitotic chromosome condensation in vitro*. Cell, 1994. **79**(3): p. 449-58.
13. Jessberger, R., et al., *SMC proteins constitute two subunits of the mammalian recombination complex RC-1*. EMBO journal, 1996. **15**(15): p. 4061-8.
14. Losada, A., M. Hirano, and T. Hirano, *Identification of Xenopus SMC protein complexes required for sister chromatid cohesion*. Genes & development, 1998. **12**(13): p. 1986-97.
15. Fousteri, M.I. and A.R. Lehmann, *A novel SMC protein complex in Schizosaccharomyces pombe contains the Rad18 DNA repair protein*. EMBO journal, 2000. **19**(7): p. 1691-702.
16. Guacci, V., D. Koshland, and A. Strunnikov, *A direct link between sister chromatid cohesion and chromosome condensation revealed through the analysis of MCD1 in S. cerevisiae.[see comment]*. Cell, 1997. **91**(1): p. 47-57.
17. Michaelis, C., R. Ciosk, and K. Nasmyth, *Cohesins: chromosomal proteins that prevent premature separation of sister chromatids*. Cell, 1997. **91**(1): p. 35-45.

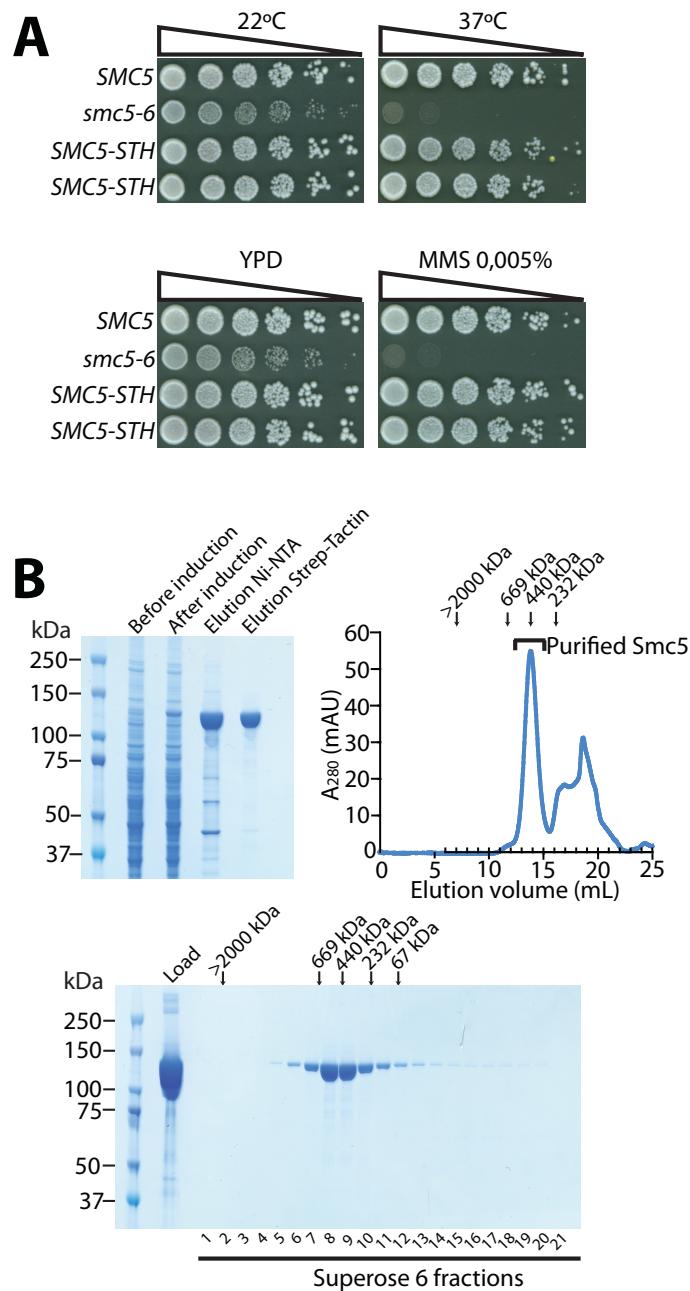
18. Hirano, T., R. Kobayashi, and M. Hirano, *Condensins, chromosome condensation protein complexes containing XCAP-C, XCAP-E and a Xenopus homolog of the Drosophila Barren protein*. Cell, 1997. **89**(4): p. 511-21.
19. Mengiste, T., et al., *An SMC-like protein is required for efficient homologous recombination in Arabidopsis*. EMBO journal, 1999. **18**(16): p. 4505-12.
20. Ghaemmaghami, S., et al., *Global analysis of protein expression in yeast*. Nature, 2003. **425**(6959): p. 737-41.
21. Torres-Rosell, J., et al., *SMC5 and SMC6 genes are required for the segregation of repetitive chromosome regions.[see comment]*. Nature Cell Biology, 2005. **7**(4): p. 412-9.
22. Sutani, T. and M. Yanagida, *DNA renaturation activity of the SMC complex implicated in chromosome condensation*. Nature, 1997. **388**(6644): p. 798-801.
23. St-Pierre, J., et al., *Polo kinase regulates mitotic chromosome condensation by hyperactivation of condensin DNA supercoiling activity*. Molecular cell, 2009. **34**(4): p. 416-26.
24. Irvine, B.G., *Molecular weight estimation for native proteins using high-performance size-exclusion chromatography*, in *The Protein Protocols Handbook*, J.M. Walker, Editor. 2002, Humana Press. p. 573-579.
25. Brown, P.H. and P. Schuck, *Macromolecular size-and-shape distributions by sedimentation velocity analytical ultracentrifugation*. Biophysical journal, 2006. **90**(12): p. 4651-61.
26. Lindroos, H.B., et al., *Chromosomal association of the Smc5/6 complex reveals that it functions in differently regulated pathways*. Mol Cell, 2006. **22**(6): p. 755-67.
27. Sancar, A. and G.B. Sancar, *DNA repair enzymes*. Annual review of biochemistry, 1988. **57**: p. 29-67.
28. Tuma, R.S., et al., *Characterization of SYBR Gold nucleic acid gel stain: a dye optimized for use with 300-nm ultraviolet transilluminators*. Analytical biochemistry, 1999. **268**(2): p. 278-88.
29. Hirano, M. and T. Hirano, *ATP-dependent aggregation of single-stranded DNA by a bacterial SMC homodimer*. EMBO journal, 1998. **17**(23): p. 7139-48.
30. Griesse, J.J., G. Witte, and K.P. Hopfner, *Structure and DNA binding activity of the mouse condensin hinge domain highlight common and diverse features of SMC proteins*. Nucleic acids research, 2010. **38**(10): p. 3454-65.
31. Sergeant, J., et al., *Composition and architecture of the Schizosaccharomyces pombe Rad18 (Smc5-6) complex*. Molecular and cellular biology, 2005. **25**(1): p. 172-84.
32. Pebernard, S., et al., *The Nse5-Nse6 dimer mediates DNA repair roles of the Smc5-Smc6 complex*. Molecular and cellular biology, 2006. **26**(5): p. 1617-30.
33. Palecek, J., et al., *The Smc5-Smc6 DNA repair complex. bridging of the Smc5-Smc6 heads by the KLEISIN, Nse4, and non-Kleisin subunits*. Journal of biological chemistry, 2006. **281**(48): p. 36952-9.
34. Duan, X., et al., *Architecture of the Smc5/6 Complex of Saccharomyces cerevisiae Reveals a Unique Interaction between the Nse5-6 Subcomplex and the Hinge Regions of Smc5 and Smc6*. Journal of biological chemistry, 2009. **284**(13): p. 8507-15.

35. Petrushenko, Z.M., et al., *DNA reshaping by MukB. Right-handed knotting, left-handed supercoiling*. Journal of biological chemistry, 2006. **281**(8): p. 4606-15.
36. Kimura, K. and T. Hirano, *ATP-dependent positive supercoiling of DNA by 13S condensin: a biochemical implication for chromosome condensation*. Cell, 1997. **90**(4): p. 625-34.
37. Losada, A. and T. Hirano, *Intermolecular DNA interactions stimulated by the cohesin complex in vitro: implications for sister chromatid cohesion*. Current Biology, 2001. **11**(4): p. 268-72.
38. Yoshimura, S.H., et al., *Condensin architecture and interaction with DNA: regulatory non-SMC subunits bind to the head of SMC heterodimer*. Current Biology, 2002. **12**(6): p. 508-13.
39. Sakai, A., et al., *Condensin but not cohesin SMC heterodimer induces DNA reannealing through protein-protein assembly*. EMBO Journal, 2003. **22**(11): p. 2764-75.
40. Akhmedov, A.T., et al., *Structural maintenance of chromosomes protein C-terminal domains bind preferentially to DNA with secondary structure*. Journal of biological chemistry, 1998. **273**(37): p. 24088-94.
41. Akhmedov, A.T., B. Gross, and R. Jessberger, *Mammalian SMC3 C-terminal and coiled-coil protein domains specifically bind palindromic DNA, do not block DNA ends, and prevent DNA bending*. J Biol Chem, 1999. **274**(53): p. 38216-24.
42. Hopfner, K.P., et al., *Structural biology of Rad50 ATPase: ATP-driven conformational control in DNA double-strand break repair and the ABC-ATPase superfamily*. Cell, 2000. **101**(7): p. 789-800.
43. Lowe, J., S.C. Cordell, and F. van den Ent, *Crystal structure of the SMC head domain: an ABC ATPase with 900 residues antiparallel coiled-coil inserted*. Journal of molecular biology, 2001. **306**(1): p. 25-35.
44. Behlke-Steinert, S., et al., *SMC5 and MMS21 are required for chromosome cohesion and mitotic progression*. Cell cycle, 2009. **8**(14): p. 2211-8.
45. Wellinger, R.J., A.J. Wolf, and V.A. Zakian, *Saccharomyces telomeres acquire single-strand TG1-3 tails late in S phase*. Cell, 1993. **72**(1): p. 51-60.
46. Sogo, J.M., M. Lopes, and M. Foiani, *Fork reversal and ssDNA accumulation at stalled replication forks owing to checkpoint defects*. Science, 2002. **297**(5581): p. 599-602.
47. Huertas, P., *DNA resection in eukaryotes: deciding how to fix the break*. Nature structural & molecular biology, 2010. **17**(1): p. 11-6.
48. Garvik, B., M. Carson, and L. Hartwell, *Single-stranded DNA arising at telomeres in cdc13 mutants may constitute a specific signal for the RAD9 checkpoint*. Molecular and cellular biology, 1995. **15**(11): p. 6128-38.
49. Lydall, D. and T. Weinert, *Yeast checkpoint genes in DNA damage processing: implications for repair and arrest*. Science, 1995. **270**(5241): p. 1488-91.
50. Laue, T.M., et al., *Computer-aided interpretation of analytical sedimentation data for proteins*, in *Analytical ultracentrifugation in biochemistry and polymer science*, S.E. Harding, J.C. Horton, and A.J. Rowe, Editors. 1992, Royal Society of Chemistry: Cambridge, U.K. p. 90-125.

51. Bianchi, M.E., *Interaction of a protein from rat liver nuclei with cruciform DNA*. EMBO journal, 1988. 7(3): p. 843-9.

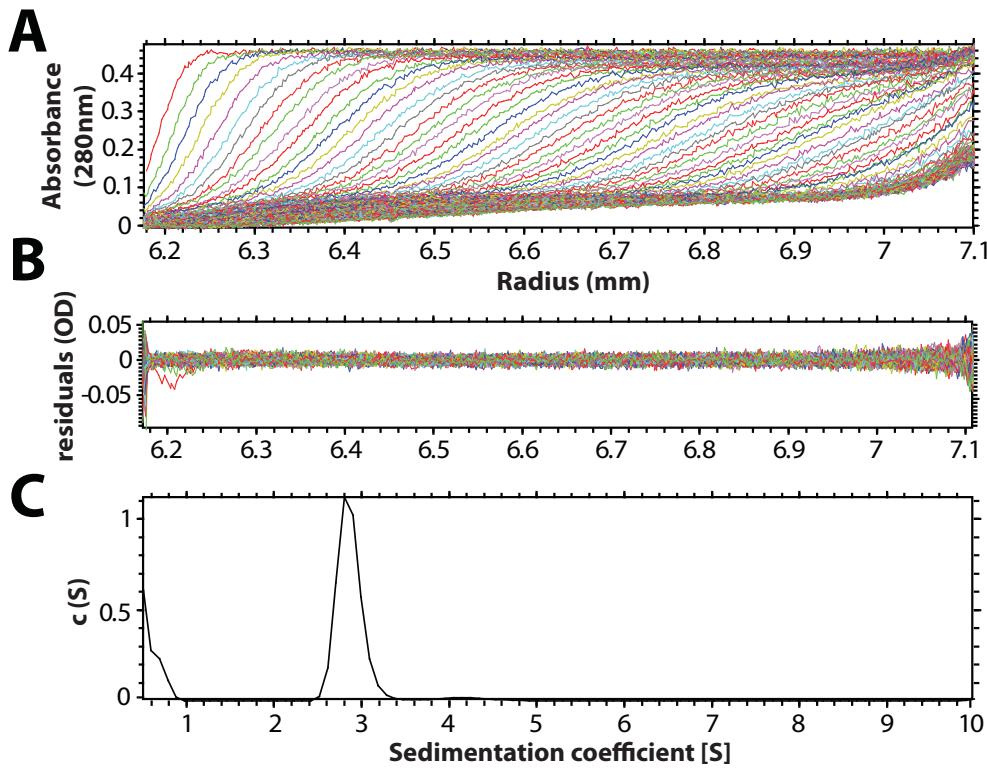
2.8) Figures

Figure 1. Purification of budding yeast Smc5



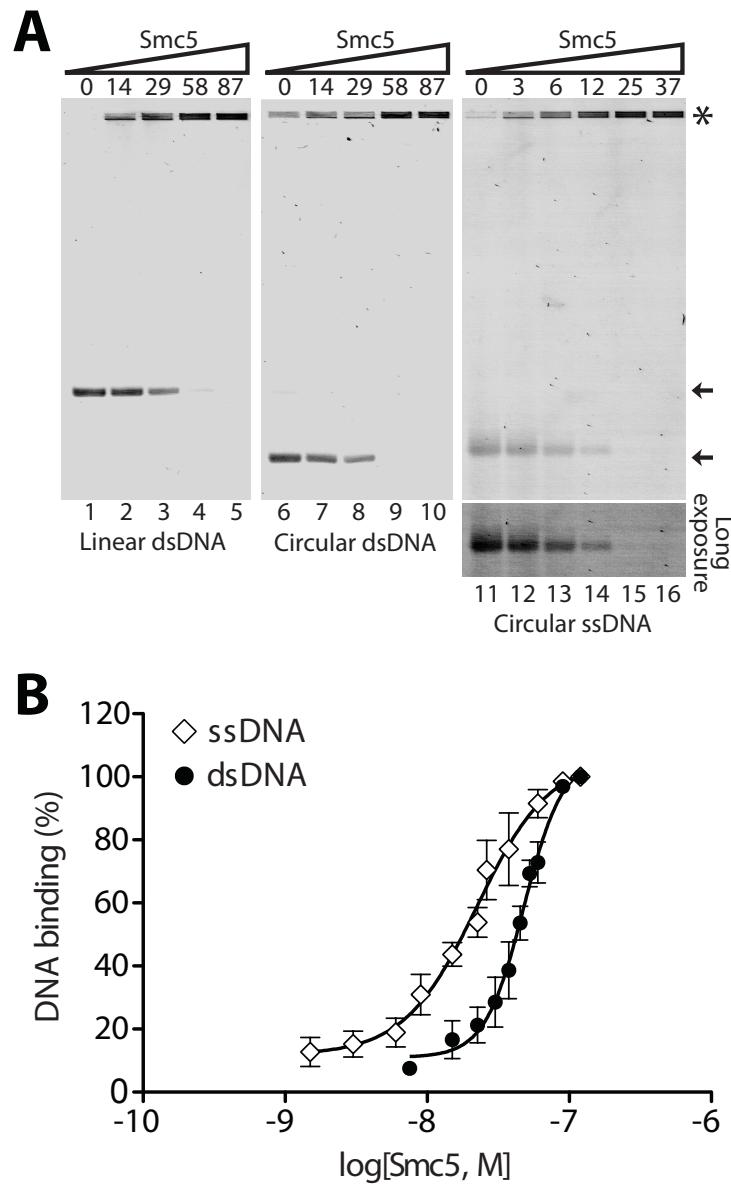
(A) Ten-fold dilution series of yeast strains carrying *SMC5*, *smc5-6* and *SMC5-STH* were spotted on control YEPD plates or YEPD plates containing MMS to evaluate the ability of cells to grow at various temperatures and in the presence DNA damage. Triangles indicate decreasing concentration of cells in spots. **(B)** Smc5 was purified from whole cell extracts by nickel-chelate and Strep-Tactin affinity chromatography followed by size exclusion chromatography on Superose 6 resin. The elution profile of Smc5 from the gel filtration column is shown in the graph on the right. The purity of Smc5 at each purification step is shown in the coomassie-stained gels.

Figure 2. Sedimentation velocity analysis of Smc5



(A) A representative experimental sedimentation profile of $\sim 5 \mu\text{M}$ purified Smc5 at a rotor speed of 40,000 rpm. Shown is the absorbance of the sample at 280nm plotted against the radial position with the colored lines representing the boundaries of the first 125 scans. **(B)** The residuals of the model fitting for the data shown as an overlay representation (r.m.s.d. = 0.0049). **(C)** The continuous sedimentation distribution, $c(S)$, corresponding to the velocity experiment is shown in black. An experimental sedimentation coefficient of $2.85 \pm 0.13 \text{ S}$ was calculated with a frictional coefficient (f/f_0) of 2.22. The $c(M)$ method of SEDFIT was used to determine a molecular mass of $123010 \pm 8864 \text{ Da}$ which corresponds to a Smc5 monomer. Similar sedimentation coefficients, molecular weight, and frictional coefficients were obtained for Smc5 ran at a different concentrations and speeds.

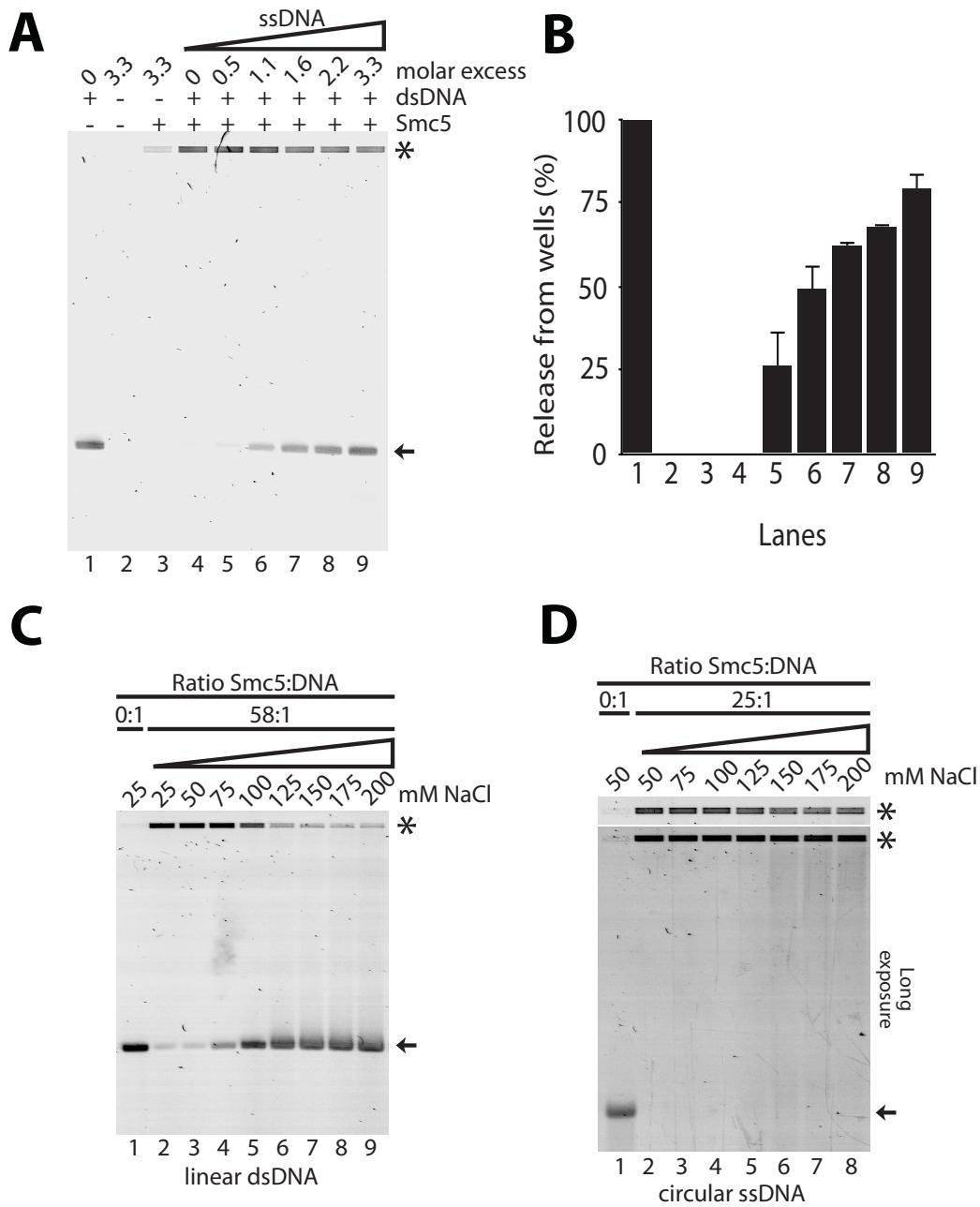
Figure 3. DNA-binding specificity and affinity of Smc5



(A) Purified Smc5 was incubated with various types of DNA for 30 min at 30°C. DNA-protein complexes were subsequently resolved on a 0.8% agarose gel and visualized by UV exposure after SYBR Green I (dsDNA) or SYBR Gold (ssDNA) staining. The types of DNA tested were linear dsDNA (left panel), circular dsDNA (middle panel), and circular ssDNA (right panel). The numbers above the gels represent the molar ratio of Smc5 relative to

DNA substrates in each lane. The asterisk marks the position of Smc5-DNA complexes in the gel, whereas arrows mark the positions of free ds or ssDNA. Note that free ssDNA migrates as a less compact band than the Smc5-bound form in the wells, thereby yielding a less intense fluorescence signal. To address this, a longer exposure of the region of the gel containing free DNA is shown below the panel on the right to illustrate the complete absence of signal at the position of free ssDNA in lanes 15 and 16. For each type of DNA, three independent experiments were performed with comparable results; representative experiments are shown. **(B)** Gel mobility-shift titration of Smc5 binding to DNA. Increasing amounts of Smc5 were assayed for DNA-binding activity with ssDNA and dsDNA plasmids, as described above. Unbound DNA and Smc5-DNA complexes were quantified throughout the titration and the data plotted as percentage of total DNA in complex with Smc5. The maximal amount of protein used at the end of this titration corresponds to 120-fold molar excess Smc5 compared to plasmid DNA. Each data point represents mean \pm standard error of three independent experiments. The binding curves fit the experimental values with a correlation coefficient (R^2) of 0.936 and 0.932 for dsDNA and ssDNA, respectively.

Figure 4. Strength of the interaction between Smc5 and DNA

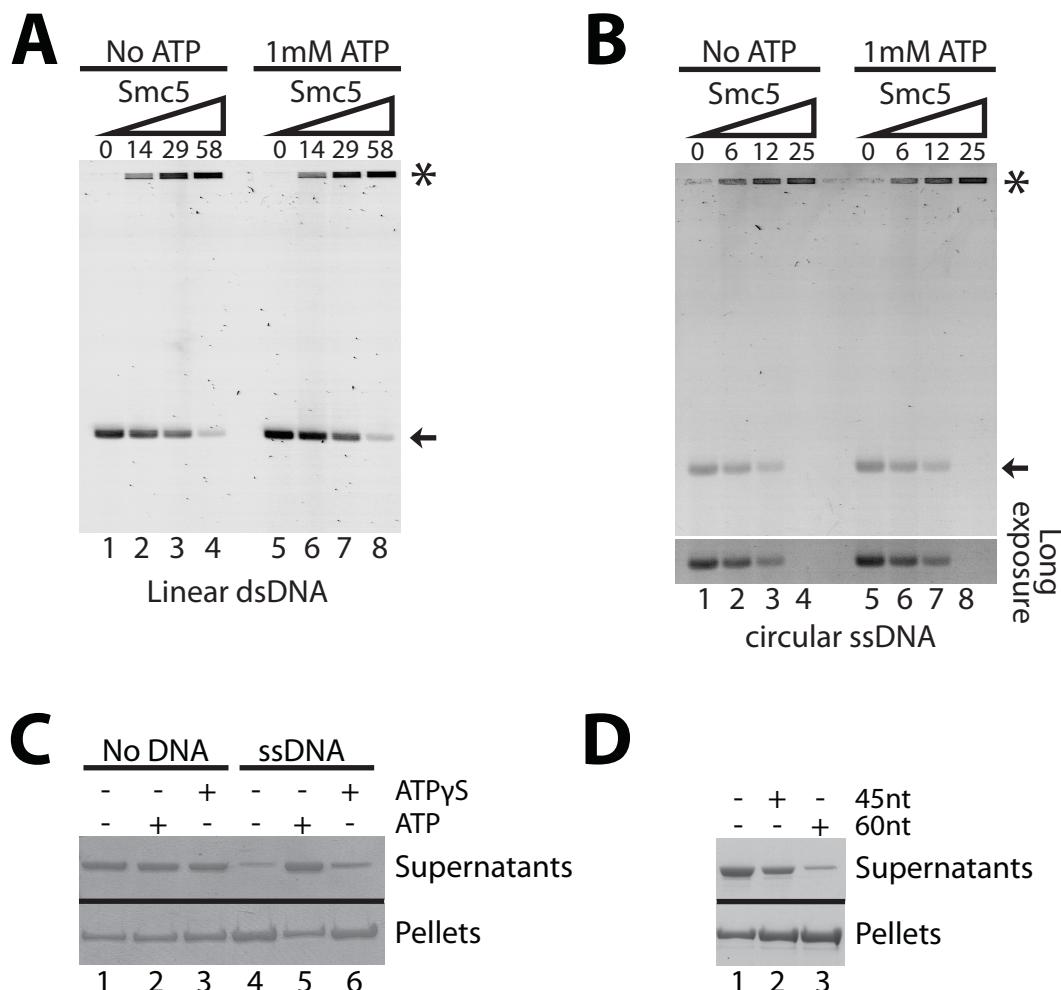


(A) Competition of the dsDNA-Smc5 interaction with ssDNA. Purified Smc5 was incubated with linear dsDNA for 15 min at 30°C. ssDNA was subsequently added at different

concentrations and incubated for another 15 min prior to resolving the resulting complexes by electrophoresis. The numbers above the gels represent the molar excess of ssDNA relative to dsDNA in each lane. Lanes 2 and 3 contains only ssDNA (same quantity as in lane 9). Note that the gel was stained with SYBR Green I, which is specific for dsDNA [28]. We confirmed that ssDNA is not detected by this staining procedure in the absence of Smc5 (see absence of signal in lane 2). However, we noted that in the presence of Smc5, we obtained a faint SYBR Green I signal for the ssDNA-Smc5 complex in the well of the gel (lane 3). Thus, to properly evaluate the results of this competition experiment, one needs to monitor the release of free dsDNA in gel, as opposed to assessing the fraction of dsDNA remaining in the well of the gel. **(B)** Quantification of the release of free dsDNA from Smc5 by increasing concentrations of ssDNA. The fraction of free DNA released from Smc5 was quantified relative to the total amount of dsDNA loaded on the gel (*i.e.*, free DNA band in lane 1 of the gel shown in panel A). Error bars indicate standard error to the mean over three independent experiments. **(C)** Salt resistance of Smc5-dsDNA complexes. Purified Smc5 was incubated with linear dsDNA in the presence of increasing concentrations of salt, and resulting Smc5-DNA complexes were resolved by electrophoresis as before. The asterisk marks the position of Smc5-DNA complexes in the gel, whereas arrows mark the positions of free dsDNA. Three independent experiments were performed with comparable results; a representative experiment is shown. **(D)** Salt resistance of Smc5-ssDNA complexes. The salt challenge experiments were performed as described above except that Smc5 was incubated with ssDNA. The top panel shows a short exposure of the region of the

gel containing the Smc5-ssDNA complex, whereas the bottom panel shows a longer exposure of the whole gel.

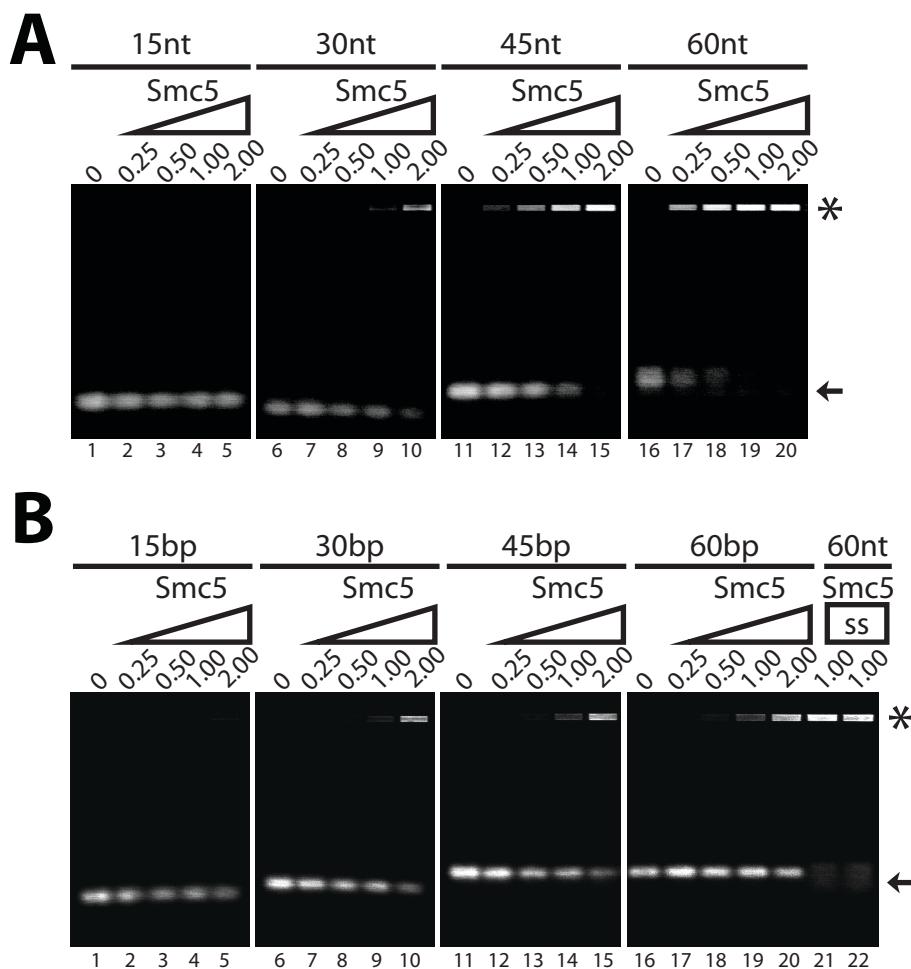
Figure 5. Effect of ATP on Smc5 DNA-binding properties



(A) Effect of ATP on the dsDNA-binding properties of Smc5. Purified Smc5 was incubated with dsDNA in the presence or absence of 1 mM ATP for 30 min at 30°C, and processed as previously described. The numbers above the gels represent the molar ratio of Smc5 relative to DNA substrates in each lane. The asterisk marks the position of Smc5-DNA complexes in the gel, whereas arrows mark the positions of free dsDNA. (B) Effect of ATP on the ssDNA-binding properties of Smc5. Purified Smc5 was incubated with ssDNA in the

presence or absence of 1mM ATP as described above. A longer exposure of the region of the gel containing free DNA is shown below the main panel to illustrate the complete absence of signal at the position of free ssDNA in lanes 4 and 8. **(C)** Role of ATP in the formation of precipitable nucleoprotein complexes between Smc5 and ssDNA. A fixed amount of Smc5 was incubated either with no DNA or with ssDNA in the absence (-) or presence (+) of ATP/ATPyS. After incubation at 30°C for 30 min, the complexes were spun at 16,000g and supernatants (top) and pellets (bottom) were analyzed by SDS-PAGE followed by coomassie blue staining. **(D)** Interaction of Smc5 complexes with short ssDNA oligonucleotides. Experiments were performed as described above except that ssDNA substrates were 45-mer and 60-mer oligonucleotides.

Figure 6. Minimal length of ssDNA required for Smc5 binding activity

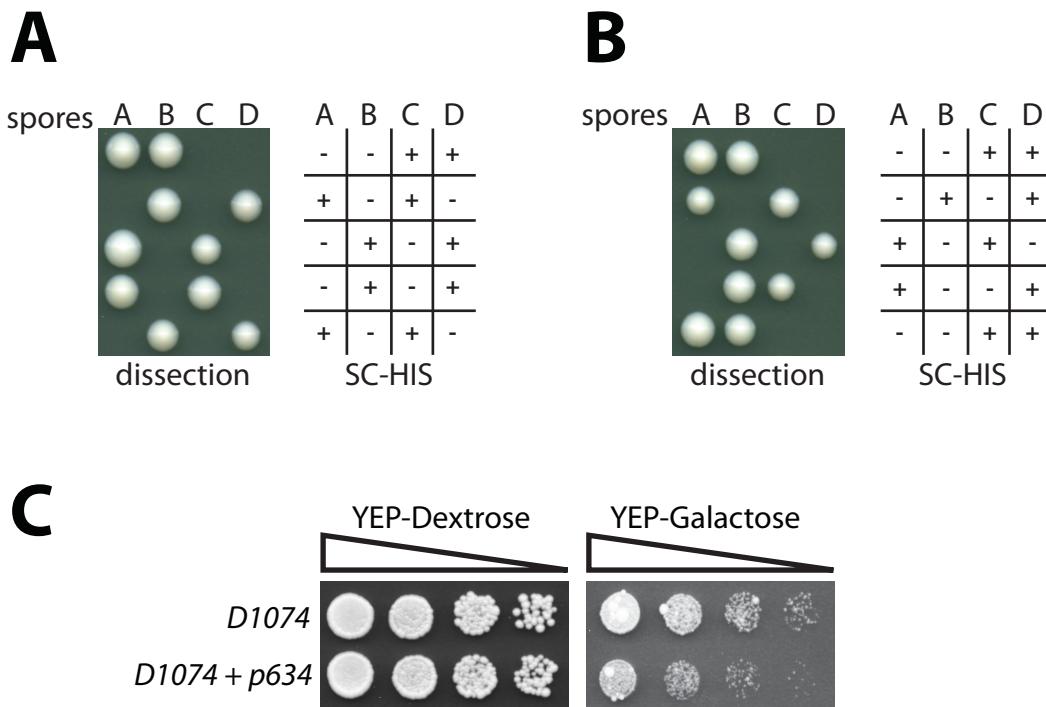


(A) Length-dependent binding of single-stranded oligonucleotides to Smc5. Purified Smc5 was incubated with ss oligonucleotides of increasing lengths (15, 30, 45, 60 nt) for 30 min at 30°C. Complexes were resolved on a 2% agarose gel and bands visualized after UV exposure. The numbers above the gels represent the molar ratio of Smc5 relative to oligonucleotide substrates in each lane. The asterisk marks the position of Smc5-DNA complexes in the gel, whereas the arrow marks the positions of free ssDNA. **(B)** Smc5 does

not bind efficiently to double-stranded oligonucleotides. Purified Smc5 was incubated with ds oligonucleotides of various lengths (15, 30, 45, 60 bp) and processed as described above. Note that the fluorophore-labeled ssDNA oligonucleotide used to make the 60-mer dsDNA template did bind Smc5 equally well with (lane 21) or without (lane 22) the heat-denaturation step used to create the dsDNA templates.

2.9) Supplementary figures

Supplementary figure 1



(A) A heterozygous diploid strain (D2282) carrying the smc5-D1014A::HIS3 mutation, which prevents ATP-binding and hydrolysis, was induced to sporulate and tetrads were dissected on YEPD plates (left). The genotype of viable segregants was deduced from their growth properties on synthetic medium lacking histidine (right). **(B)** A heterozygous diploid strain (D2285) carrying the transition-state smc5-E1015Q::HIS3 mutation was induced to sporulate and tetrads were dissected and analyzed as in panel A. **(C)** Overexpression of Smc5 affects cell growth. Dilution series of control cells (D1074) and cells overexpressing Smc5 from the GAL1 promoter (D1074 + plasmid p634) were spotted on YEP-Dextrose (left;

repressive condition) and YEP-Galactose (right; *Smc5* overexpression condition) plates to evaluate cell growth.

3.0) Caractérisation de l'interaction entre Smc6 et l'ADN

DNA-binding properties of Smc6, a core component of the Smc5-6 DNA repair complex

Marc-André Roy and Damien D'Amours*

Institute for Research in Immunology and Cancer and Département de Pathologie et Biologie Cellulaire, Université de Montréal, Montréal, Canada.

*Corresponding author

Institute for Research in Immunology and Cancer

Université de Montréal

P.O. Box 6128, Succursale Centre-Ville

Montréal, QC, H3C 3J7, CANADA

3.1) Abstract

The Smc5-6 complex is an essential regulator of chromosome integrity and a key component of the DNA damage response. As an essential DNA repair factor, the Smc5-6 complex is expected to interact with DNA and/or chromatin during the execution of its functions. How the Smc6 protein promotes the binding of the Smc5-6 complex to DNA lesions is currently unknown. We show here that Smc6 is a strong DNA-binding protein with a clear preference for single-stranded DNA substrates. Importantly, Smc6 associates with DNA in the absence of other Smc5-6 complex components and its activity is modulated by nucleotides. Our results also show that the minimal size of single-stranded DNA required for tight association with Smc6 is ~60 nucleotides in length. Taken together, our results suggest that Smc6 contributes to DNA repair *in vivo* by targeting the Smc5-6 complex to single-stranded DNA substrates created during the processes of homologous recombination and/or DNA replication.

Key words

DNA repair, genome integrity, structural maintenance of chromosomes, Smc5-6 complex.¹

3.2) Introduction

The ability to maintain genome integrity is fundamental to all living organisms. To achieve this, several families of proteins have evolved in eukaryotes to promote effective detection and repair of DNA damage. Among these, stability and maintenance of chromosomes (SMC) family of proteins forms a unique group that acts at diverse levels to ensure chromosome homeostasis (reviewed in [1, 2]). Inactivation of any SMC family member leads to genome instability and lethality, a phenotype that illustrates the critical importance of SMC function for cellular vitality.

There are 6 conserved SMC family members in eukaryotes, Smc1 to 6. These are involved in diverse processes including chromosome condensation, sister-chromatid cohesion, and repair of DNA lesions [1]. How these proteins promote such distinct functions is unclear at present. Insights into the mode-of-action of SMC family proteins are suggested by their unique organization as well as their pattern of association with other proteins. Indeed, as they acquire their mature configuration, SMC proteins are known to fold into highly elongated structures containing an asymmetrically-localized ATPase activity [3, 4]. Electron microscopy experiments revealed that the resulting SMC "rod" can spend as much as 60 nm in length and shows limited flexibility. In addition to these physical properties, SMC proteins act as dimers with distinct and predetermined SMC family members [1]. Specifically, Smc1 and Smc3 associate to form a complex known as cohesin, whereas binding of Smc2 to Smc4 results in the formation of the condensin complex [1]. Two other SMC proteins initially discovered in fission yeast [5, 6] –Smc5 and

Smc6– are now known to form a novel and evolutionarily-conserved DNA repair complex in eukaryotes (reviewed in [2, 7, 8]). Ultimately, the 3 conserved pairs of Smc dimers associate with several additional proteins to form large complexes with multiple biochemical activities.

It has been proposed that the combination of unique structural configuration together with the presence of an asymmetric ATPase domain results in mechano-chemical activities in SMC proteins. Moreover, the ability of cohesin and condensin to create topological links in chromosomal DNA [9, 10] suggests that the molecular function of SMC complexes is to hold two distinct DNA molecules or distant regions of a specific chromosome in close proximity. However, how SMC complexes first identify and then bind to various chromosomal sites *in vivo* is less clear. In particular, little is known about the nature of the mechanism used by the Smc5-6 complex to interact with DNA substrates in live cells [11-14]. Furthermore, the fact that the Smc5-6 complex is involved in DNA double-strand break (DSB) repair may impose special requirements on its interaction with DNA substrates. Indeed, it has been demonstrated that association of SMC complexes to DNA molecules through topological linkages cannot be maintained in the presence of DSBs [9]. The fact that the Smc5-6 complex must act in proximity to DNA lesions, including DSBs, suggests that association of this complex with chromosomal DNA may depend on alternative DNA-binding mechanisms relative to condensin and cohesin. In this regard, it is interesting to note that, unlike other SMC proteins, Smc5 and Smc6 appear to work independently of each other under certain circumstances *in vivo* [15].

To better understand how the Smc5-6 complex might regulate the repair of chromosomal DNA, we previously undertook an extensive biochemical analysis of purified Smc5 [16]. We now report the first biochemical characterization of the DNA-binding activity of Smc6, the core binding partner of Smc5.

3.3 Materials and methods

Yeast strains and molecular biology

All yeast strains used in this study are derivatives of W303. Standard procedures were used for yeast culture, genetic manipulations and molecular biology [17]. For protein overexpression, *SMC6* coding sequence was fused at its N-terminus to a tandem affinity purification tag (9x His – 3x Streptag II; hereafter referred to as the HST tag) and subcloned downstream of the *GAL1* promoter in a 2 μ -derived plasmid (p718).

Protein overexpression and purification

Smc6 was overexpressed in yeast strain D2131 (*Mata lys2::Pgal1-GAL4 pep4::HIS3 bar1::hisG p718 [2 μ URA3 leu2-d P_{GAL1}-HST-SMC6]*). Purification of Smc6 by Ni-NTA and Streptactin chromatography was performed according to previously-described procedures [16]. Following Streptactin chromatography, the eluate was diluted 15 fold with buffer A (50mM KH₂PO₄/K₂HPO₄ pH6.4, 5% glycerol, 0.2% Tween 20, 1 mM EDTA, 2 mM 2-mercaptoethanol) and loaded on a HiTrap SP FF column (GE Healthcare). The column was washed with 10CV of buffer B (50 mM KH₂PO₄/K₂HPO₄ pH6.4, 50 mM NaCl, 15% glycerol, 0.2% Tween 20, 1 mM EDTA, 2 mM 2-mercaptoethanol) and eluted with 5CV of buffer C (50 mM KH₂PO₄/K₂HPO₄

pH8.0, 1 M NaCl, 15% glycerol, 0.2% Tween 20, 1 mM EDTA, 2 mM 2-mercaptoethanol).

Final fractions containing Smc6 were concentrated to ~0.5 mg/mL and stored at -80°C.

DNA binding and pelleting assays

All DNA binding assays were performed according to Roy *et al.* [16] with minor modifications. Specifically, DNA binding experiments using oligonucleotide templates were performed in reaction buffer containing 10 mM Hepes pH7.5, 75 mM NaCl, 7 mM MgCl₂, 2 mM 2-mercaptoethanol, and 7.5 pmol DNA oligonucleotides. The sequences of the 75-mer oligonucleotides used in EMSA experiments are: oligo1635: 5'- 6-carboxyfluorescein (FAM)-CCAGTGAATTGTAATACGACTCACTATAGGGCGAATTGGAGCTCCACCGCGGTGGCG GCCGCCGGCGCACCTGTC-3'; oligo1636: 5'-GACAGGTGCGCCGGCGGCCACCGC GGTGGAGCTCCAATTGCCCTATAGTGAGTCGTATTACAATTCACTGG-3'. All other substrates and conditions are as described in [16]. Pelleting assays were performed as before [15] except that DNA was omitted from the reaction mixture and Smc6 was visualized by western-blotting using an anti-StreptagII antibody (Qiagen).

3.4) Results

Purification of Smc6

To characterize the biochemical properties of Smc6, we first needed to purify large amounts of the protein. Although small fragments of eukaryotic Smc6 have been successfully purified from bacteria in the past [18, 19], large amounts of the full-length protein have never been purified from any organism so far. Protein overexpression is likely

necessary for this because Smc6 is normally expressed at low levels –339 copies per cell– in yeast [20]. Initial tests demonstrated that addition of an affinity tag at the carboxy-terminus of Smc6 was ineffective for purification because it reduced the solubility of the protein (data not shown). We therefore fused the amino-terminus of Smc6 to the HST tag sequence, a short tandem affinity tag for purification. This tag allows for rapid and effective two-step purification of overexpressed proteins in yeast [16, 17]. Strains carrying the HST-tagged version of *SMC6* at its endogenous locus were viable and grew well (Fig. 1A; compare with *smc6-56* mutant), which indicates that the tagged protein is functional. Importantly, expression of *HST-SMC6* from a multicopy plasmid resulted in high levels of soluble Smc6 in yeast lysates. The amino-terminal tag on Smc6 was both accessible and effective for purification of the soluble fraction of Smc6. Indeed, we could purify Smc6 to more than 95% homogeneity when using consecutive steps of metal-chelate and streptactin chromatography, followed by an additional step of ion exchange chromatography (Fig. 1B). Using this procedure, we obtained a typical yield of ~0.32 nmole of pure Smc6 per 6 L of culture. This purification yield is modest compared to the yield obtained previously with Smc5 [15], but is nevertheless sufficient to conduct key biochemical assays. Interestingly, although the calculated molecular weight of Smc6 is very similar to that of Smc5 (128 vs 126 kDa, respectively), both proteins migrated at distinct positions during SDS-PAGE (Fig. 1B). This allowed us to confirm that the purified Smc6 fraction was largely devoid of contamination from Smc5, which is consistent with the fact that some steps of the purification procedure are performed under ionic conditions that are unlikely to be compatible with complex formation.

DNA-binding activity of Smc6

We next determined the specific contribution of Smc6 to the overall DNA-binding properties of the Smc5-6 complex. As an essential DNA repair factor, Smc6 is expected to interact with DNA and/or chromatin during the execution of its functions. However, we previously observed that Smc6-binding partner, Smc5, has strong DNA-binding activity in the absence of all other components of the complex [16]. This raises the possibility that Smc5 might be sufficient on its own to mediate all DNA-binding activity within the Smc5-6 complex. Alternatively, Smc6 could contribute to the overall DNA-binding activity of the complex by providing a separate high-affinity interaction site for DNA.

To discriminate between these two possibilities, we investigated the putative DNA-binding activity of purified Smc6 using electrophoretic mobility shift assays (EMSAs). Specifically, various concentrations of Smc6 were allowed to interact with a set amount of DNA molecules and the resulting complexes were separated by agarose gel electrophoresis [16]. Interactions between proteins and DNA in this assay typically cause a retardation in the migration of DNA molecules in the gel. We tested the interaction between Smc6 and DNA substrates of various configurations, including circular dsDNA plasmids, linear dsDNA fragments, and circular ssDNA plasmids. Remarkably, these EMSA experiments revealed that Smc6 interacts quantitatively with all types of DNA molecules tested (Fig. 2A). Specifically, increasing the amount of Smc6 in DNA-binding reactions resulted in a concentration-dependent formation of protein-DNA complexes that had reduced mobility during electrophoresis (*i.e.*, see DNA signal next to asterisk in Fig. 2A). The low mobility of

Smc6-DNA complexes in gels is a general characteristic observed with a large number of SMC proteins, as previously noted (see [21] and references cited therein). This behavior could be explained by multiple factors, such as high Smc6 occupancy on individual plasmid molecules, formation of intermolecular protein-DNA networks, and neutralization (or dampening) of the overall charge of DNA when associated with proteins [21]. Importantly, the minimal molar excess of Smc6 required to observe a full retardation of ssDNA substrates in EMSA assays is more than 3-fold lower than the concentration required to achieve the same with dsDNA substrates (*i.e.*, 37- vs 120-fold molar excess; lanes 6, 12, and 18 in Fig. 2A). This result indicates that Smc6 binds preferentially to ssDNA relative to linear or circular dsDNA. Moreover, the fact that Smc6 associated with similar efficiency to circular and linear dsDNAs indicates that this protein is unlikely to interact with DNA ends (Fig. 2A).

We next wanted to identify the minimal size of DNA required to establish an interaction with Smc6. EMSA experiments were conducted as described above using fluorescent ssDNA and dsDNA substrates of various lengths (*i.e.*, from 30 to 75 nt/bp oligonucleotides). Within the range of Smc6 concentrations tested, we detected very little binding of Smc6 on dsDNA or ssDNA substrates shorter than 45 nt/bp (Fig. 2B-C). However, ssDNA substrates of 60 and 75 nt in length associated with Smc6 efficiently, as determined by the disappearance of the free DNA signal in the part of the gels containing the highest concentrations of Smc6 (Fig. 2B; lanes 14-15, 19-20). Importantly, quantitative binding of Smc6 to the 75-mer ssDNA oligonucleotide lead to the formation of a single low mobility DNA band when the two partners interacted in equimolar amounts (Fig. 2B; lane 19). In

striking contrast, double-stranded versions of the 60-mer and 75-mer DNA substrates bound very poorly to Smc6 (Fig. 2B). It is important to note that the dsDNA substrates used in these experiments were made by annealing the ssDNA substrates used above to complementary oligonucleotides, thereby excluding sequence-specific effects as an explanation for the differential behavior of Smc6 in these experiments. Collectively, these results confirm and extend our previous experiments with large DNA substrates by showing that Smc6 binds efficiently and preferentially to ssDNA oligonucleotide as short as 60 nt in length.

Strength of the interaction between DNA and Smc6

To further address the biological relevance of Smc6's DNA-binding activity, we next determined whether this activity could be observed under salt concentrations that more closely mimic intracellular conditions. To this end, we incubated Smc6-DNA complexes in the presence of increasing concentrations of salt, from 50 to 200 mM, and resolved the resulting mixtures by gel electrophoresis. In these experiments, we used the minimal concentration of Smc6 necessary to induce maximal DNA retardation in EMSA experiments (*i.e.*, 120- and 37-fold molar excess Smc6 relative to dsDNA and ssDNA, respectively; Fig. 1A). As shown in Figure 3A, the interaction between Smc6 and dsDNA could be readily challenged by salt concentrations of 150 mM NaCl and more. In fact, concentrations of salt as low as 100 mM caused significant dissociation of Smc6-dsDNA complexes (Fig. 3A; lane 4). In contrast, ssDNA remained tightly associated with Smc6 at physiological concentrations of salts (Fig. 3B; lane 6). Increasing salt concentrations over 150 mM did

reduce the total amount of fully-retarded ssDNA in the gel (see the light exposure panel in Fig. 3B), but the released material did not migrate at the position corresponding to free DNA. Instead, the DNA released from low mobility complexes migrated as a diffuse smear in the upper part of the gel (see darker exposure panel in Fig. 3B). This indicates that the Smc6-ssDNA interaction is largely maintained at supraphysiological concentrations of salts (Fig. 3B; lanes 7-8). Taken together, these results demonstrate that the interaction between Smc6 and ssDNA can readily occur under ionic conditions characteristic of the intracellular milieu.

Effect of ATP on the interaction between DNA and Smc6

SMC proteins are ABC-type ATPase and it has been shown previously that the presence of ATP can affect a number of biochemical activities associated with this family of proteins [1]. This observation prompted us to ask whether ATP regulates the DNA-binding activity of Smc6 in EMSA experiments. Interestingly, we observed a modest but reproducible stimulation of Smc6 binding to ssDNA in the presence of 1 mM ATP, whereas no effect of ATP was detected on Smc6 binding to dsDNA (Fig. 4A-B; compare the levels of free DNA in lanes 2-3 and 7-8 in Fig. 4B). The stimulatory effect of ATP on the binding of Smc6 to ssDNA is similar to what has been observed with bacterial SMC proteins, but contrasts with the ATP-mediated inhibition seen with Smc5 [16]. We next wanted to use a DNA-induced Smc6 pelleting assay to further characterize the effects of ATP on Smc6 [22]. Unfortunately, we observed that Smc6 precipitated independently of DNA when centrifuged at high speed (lane 1; Fig. 4C), making this assay unsuitable to monitor Smc6

binding to DNA. Remarkably, however, we noticed that the presence of ADP, and to a lesser extent ATP or ATP γ S, made Smc6 resistant to centrifugation-induced pelleting (lanes 2-4; Fig. 4C). This result suggests that binding of ADP or ATP on Smc6 may induce a change in its conformation that ultimately affects its solubility when exposed to high-speed centrifugation. Taken together with the EMSA experiments, these results indicate that Smc6 physical properties and DNA-binding activities are altered in the presence of nucleotides.

3.5) Discussion

Since its initial discovery in fission yeast [5, 6], much work has been performed to understand the functions of the Smc5-6 complex in eukaryotes. Genetic analyses of Smc5-6 complex components have demonstrated their crucial importance to the DNA damage response (reviewed in [2, 7, 8]). Yet, we still know surprisingly little about the specific biochemical nature of the mechanisms used by the Smc5-6 complex to promote genome stability. This prompted us to undertake the first extensive biochemical characterization of native full-length Smc6 in eukaryotes. This analysis revealed that Smc6 is in fact a strong DNA-binding protein with a clear preference for DNA substrates in a single-stranded conformation. Furthermore, we show that the ssDNA-binding activity of Smc6 occurs at physiological salt concentrations and is modulated by the presence of ADP/ATP. Importantly, the DNA-binding activity demonstrated by Smc6 in *in vitro* experiments provides critical insights into the nature of the physiological targets of the Smc5-6 complex in live cells. Indeed, our results strongly suggest that the Smc5-6 complex has the ability to

directly associate with ssDNA intermediates created during DNA repair, recombination and/or replication *in vivo*. Additional lines of evidence further support this interpretation. First, we show that the minimal length of ssDNA required to interact with Smc6 is consistent in size with ssDNA formed during the processes of DNA repair and replication [23-25]. Second, it has been recently demonstrated that the Smc5-6 complex acts as a negative regulator of ssDNA accessibility during the repair of heterochromatic/repetitive regions of chromosomes [26, 27]. In this regard, our work strongly suggests that the Smc5-6 complex could perform this function by directly binding to ssDNA, and thus preventing other DNA repair factor from accessing this substrate. Finally, the fact that the substrate preference reported herein for Smc6 is very similar to that observed for Smc5 [16] further strengthens the notion that ssDNA intermediates are the physiological substrates recognized by the Smc5-6 complex *in vivo*.

Another surprising observation from our work is that Smc6 can interact with DNA independently of other components of the Smc5-6 complex. Previous work has suggested that the DNA-binding activity of some SMC complexes requires hinge domain-mediated SMC dimer formation (reviewed in [1]). In this regard, it is interesting to note that the hinge regions of Smc5 and Smc6 are both significantly different from those of other SMC family members [18]. This difference may be the reason why Smc5 and Smc6 are able to interact with DNA independently of heterodimer formation. Alternatively, it is possible that these proteins have evolved completely novel (or additional) DNA-binding domains to accommodate the specific DNA repair functions associated with the Smc5-6 complex. In

particular, the ability of Smc5 and Smc6 proteins to bind DNA independently of each other addresses a potential shortcoming of using a topological mode of binding to DNA. Indeed, it has been demonstrated previously that topological linkages between two DNA duplexes cannot be efficiently maintained when a DNA break is introduced in one of the trapped DNA molecule [9]. This limitation has to do with the fact that DNA fragments are not restrained in all dimensions within a SMC ring and the presence of a DSB may allow one of the DNA fragment to "fall off" the topological restraints if it slides out of the SMC ring. In contrast, we show herein (and elsewhere [16]) that Smc5 and Smc6 binding to DNA is not significantly influenced by the presence of DSBs, making it unlikely that either protein binds DNA topologically in our assays. Thus, in the context of DNA repair, the ability of Smc5 and Smc6 to bind DNA independently of each other may represent an alternative mechanism to topological linkages for the maintenance of a tight association between two distinct pieces of DNA. In such a way, the Smc5-6 complex could promote DNA "bridging" functions during DSB repair, as initially suggested by Fousteri and Lehmann [6]. Nevertheless, it is important to consider the possibility that –as a complex– Smc5-6 might also bind DNA topologically, in addition to the mode of binding observed in this study. Determining how these two mechanisms might collaborate to promote Smc5-6 complex function *in vivo* will require detailed structural analyses of Smc5 and Smc6 proteins.

3.6) Acknowledgements

We would like to thank Julie St-Pierre for comments on the manuscript. This study was supported by a grant from the CIHR to D.D. (MOP-82912). D.D. is recipient of a Tier II Canada Research Chair in Cell Cycle Regulation and Genomic Integrity.

Abbreviations: CV, column volume; DSB, DNA double-strand break; EMSA, electrophoretic mobility shift assay; HST, 9xHIS-3xStreptagII tag; SMC, stability and maintenance of chromosomes; dsDNA, double-stranded DNA; ssDNA, single-stranded DNA.

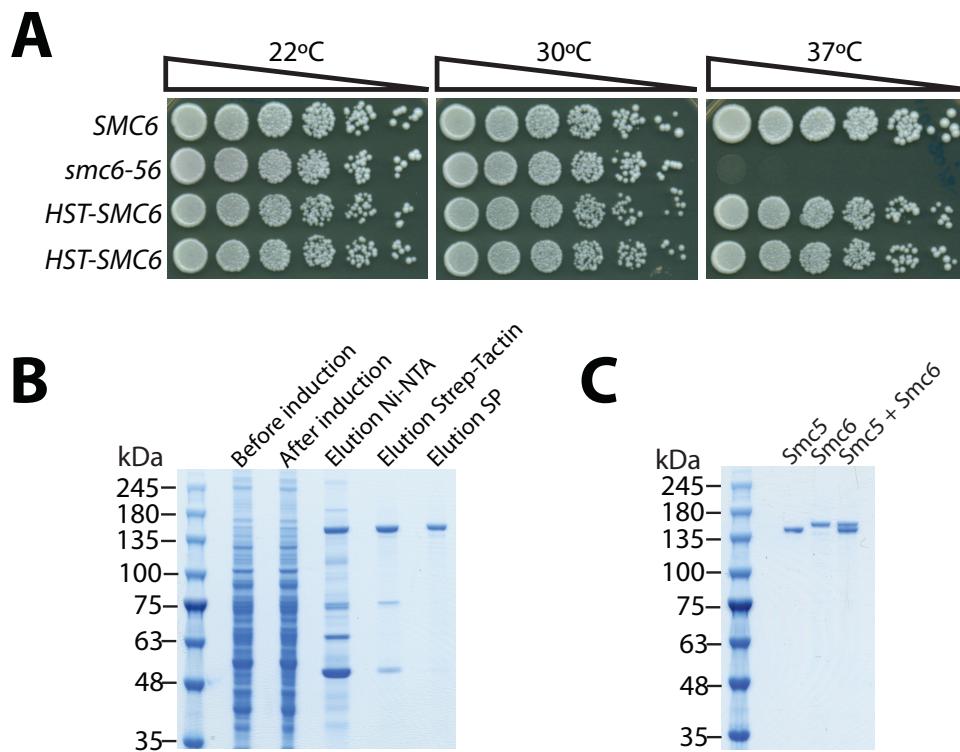
3.7) References

1. Hirano, T., *At the heart of the chromosome: SMC proteins in action*. Nature reviews. Molecular cell biology, 2006. **7**(5): p. 311-22.
2. Kegel, A. and C. Sjogren, *The Smc5/6 complex: more than repair?* Cold Spring Harb Symp Quant Biol, 2010. **75**: p. 179-187.
3. Anderson, D.E., et al., *Condensin and cohesin display different arm conformations with characteristic hinge angles*. Journal of cell biology, 2002. **156**(3): p. 419-24.
4. Yoshimura, S.H., et al., *Condensin architecture and interaction with DNA: regulatory non-SMC subunits bind to the head of SMC heterodimer*. Current biology, 2002. **12**(6): p. 508-13.
5. Lehmann, A.R., et al., *The rad18 gene of Schizosaccharomyces pombe defines a new subgroup of the SMC superfamily involved in DNA repair*. Molecular and cellular biology, 1995. **15**(12): p. 7067-80.
6. Fousteri, M.I. and A.R. Lehmann, *A novel SMC protein complex in Schizosaccharomyces pombe contains the Rad18 DNA repair protein*. EMBO Journal, 2000. **19**(7): p. 1691-702.
7. De Piccoli, G., J. Torres-Rosell, and L. Aragon, *The unnamed complex: what do we know about Smc5-Smc6?* Chromosome research, 2009. **17**(2): p. 251-63.
8. Murray, J.M. and A.M. Carr, *Smc5/6: a link between DNA repair and unidirectional replication?* Nature reviews. Molecular cell biology, 2008. **9**(2): p. 177-82.
9. Ivanov, D. and K. Nasmyth, *A Topological Interaction between Cohesin Rings and a Circular Minichromosome*. Cell, 2005. **122**(6): p. 849.
10. Cuylen, S., J. Metz, and C.H. Haering, *Condensin structures chromosomal DNA through topological links*. Nature structural & molecular biology, 2011. **18**(8): p. 894-901.
11. Torres-Rosell, J., et al., *SMC5 and SMC6 genes are required for the segregation of repetitive chromosome regions.[see comment]*. Nature Cell Biology, 2005. **7**(4): p. 412-9.
12. Lindroos, H.B., et al., *Chromosomal association of the Smc5/6 complex reveals that it functions in differently regulated pathways*. Molecular cell, 2006. **22**(6): p. 755-67.
13. Tsuyama, T., et al., *Chromatin loading of Smc5/6 is induced by DNA replication but not by DNA double-strand breaks*. Biochemistry & Biophysical research communication, 2006. **351**(4): p. 935-939.
14. Pebernard, S., et al., *Localization of Smc5/6 to centromeres and telomeres requires heterochromatin and SUMO, respectively*. EMBO journal, 2008. **27**(22): p. 3011-23.
15. Behlke-Steinert, S., et al., *SMC5 and MMS21 are required for chromosome cohesion and mitotic progression*. Cell cycle, 2009. **8**(14): p. 2211-8.
16. Roy, M.A., N. Siddiqui, and D. D'Amours, *Dynamic and selective DNA-binding activity of Smc5, a core component of the Smc5-Smc6 complex*. Cell cycle, 2011. **10**(4): p. 690-700.
17. St-Pierre, J., et al., *Polo kinase regulates mitotic chromosome condensation by hyperactivation of condensin DNA supercoiling activity*. Molecular cell, 2009. **34**(4): p. 416-26.

18. Sergeant, J., et al., *Composition and architecture of the Schizosaccharomyces pombe Rad18 (Smc5-6) complex*. Molecular and cellular biology, 2005. **25**(1): p. 172-84.
19. Duan, X., et al., *Architecture of the Smc5/6 Complex of Saccharomyces cerevisiae Reveals a Unique Interaction between the Nse5-6 Subcomplex and the Hinge Regions of Smc5 and Smc6*. Journal of biological chemistry, 2009. **284**(13): p. 8507-15.
20. Ghaemmaghami, S., et al., *Global analysis of protein expression in yeast*. Nature, 2003. **425**(6959): p. 737-41.
21. Stray, J.E. and J.E. Lindsley, *Biochemical analysis of the yeast condensin Smc2/4 complex: an ATPase that promotes knotting of circular DNA*. Journal of Biological Chemistry, 2003. **278**(28): p. 26238-48.
22. Hirano, M. and T. Hirano, *Hinge-mediated dimerization of SMC protein is essential for its dynamic interaction with DNA*. EMBO journal, 2002. **21**(21): p. 5733-44.
23. Wellinger, R.J., A.J. Wolf, and V.A. Zakian, *Saccharomyces telomeres acquire single-strand TG1-3 tails late in S phase*. Cell, 1993. **72**(1): p. 51-60.
24. Sogo, J.M., M. Lopes, and M. Foiani, *Fork reversal and ssDNA accumulation at stalled replication forks owing to checkpoint defects*. Science, 2002. **297**(5581): p. 599-602.
25. Huertas, P., *DNA resection in eukaryotes: deciding how to fix the break*. Nature structural & molecular biology, 2010. **17**(1): p. 11-6.
26. Torres-Rosell, J., et al., *The Smc5-Smc6 complex and SUMO modification of Rad52 regulates recombinational repair at the ribosomal gene locus*. Nature cell biology, 2007. **9**(8): p. 923-31.
27. Chiolo, I., et al., *Double-strand breaks in heterochromatin move outside of a dynamic HP1a domain to complete recombinational repair*. Cell, 2011. **144**(5): p. 732-44.

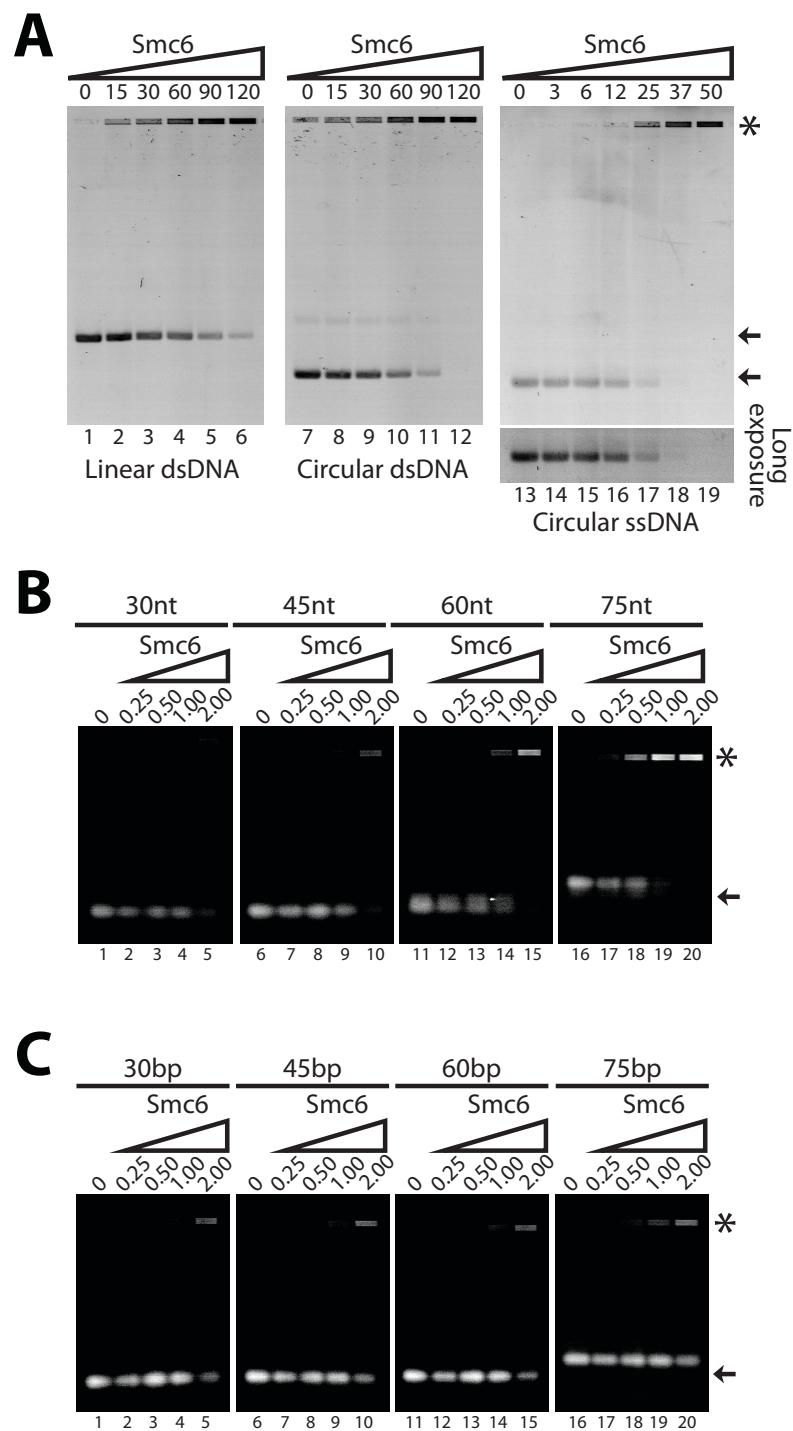
3.8) Figures

Figure 1. Purification of yeast Smc6.



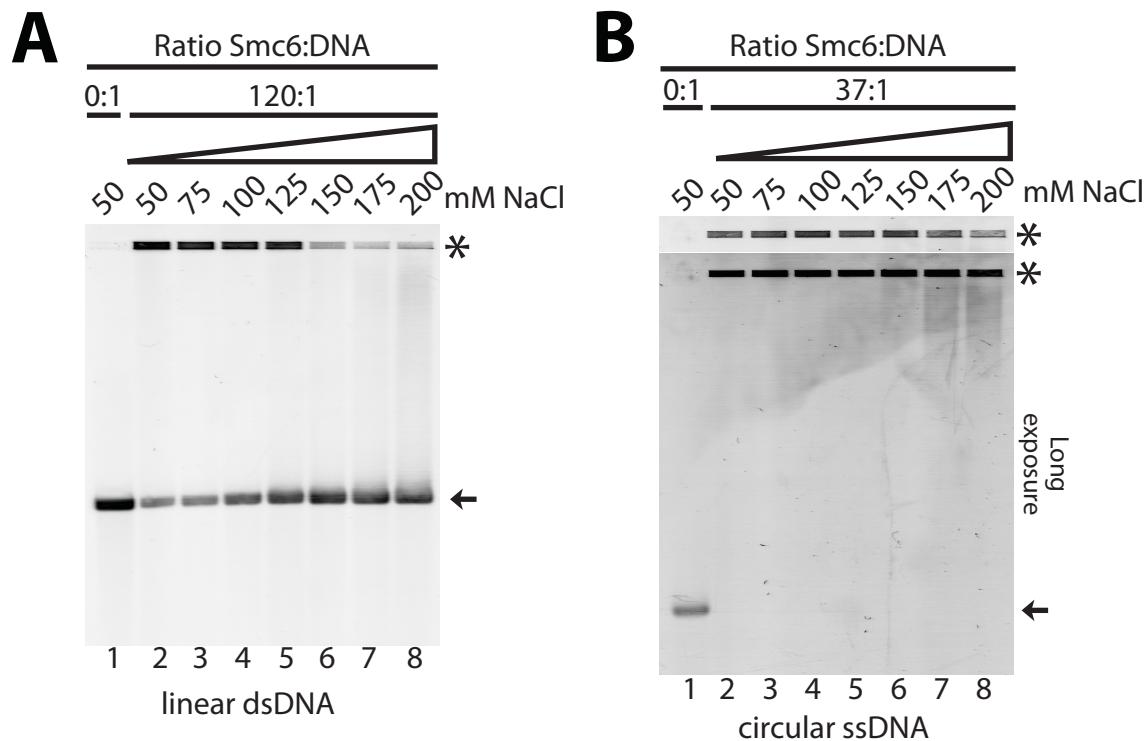
(A) Ten-fold dilution series of yeast carrying *SMC6*, *smc6-56* or *HST-SMC6* were spotted on YEPD medium to evaluate cell growth at various temperatures. Two independent clones carrying the HST-tagged allele of *SMC6* were tested. (B) Smc6 was purified from yeast whole cell extract by nickel-NTA and Streptactin affinity chromatography followed by ions exchange chromatography on HiTrap SP column. The purity of Smc6 at each purification step was evaluated by coomassie-staining. (C) The relative molecular weight of purified Smc5 and Smc6 was evaluated after electrophoresis, as described above. Purified proteins were loaded in equal amounts in each lane.

Figure 2. Characterization of the DNA-binding properties of yeast Smc6.



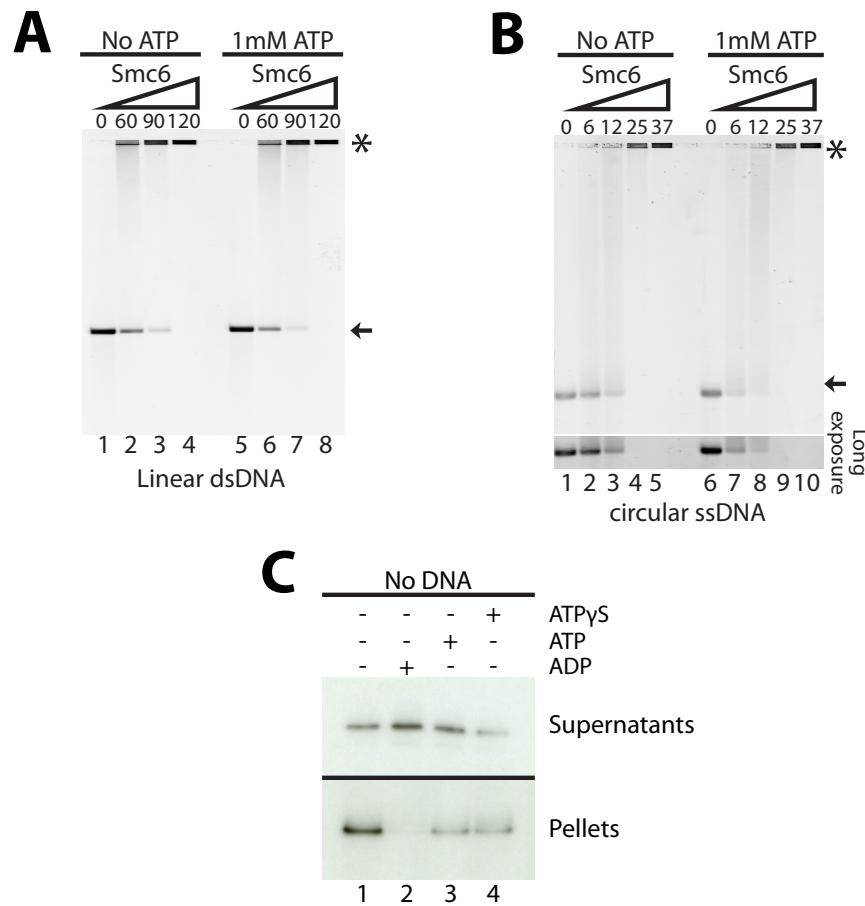
(A) The DNA-binding activity of Smc6 was evaluated in the presence of different forms of plasmid DNA (left: linear dsDNA; center: circular dsDNA; right: circular ssDNA). Smc6-DNA complexes were resolved on a 0.8% agarose gel and visualized using UV exposure after SYBR Green I or SYBR Gold staining (for dsDNA and ssDNA, respectively). A longer exposure of the region of the gel containing free DNA is shown below the main ssDNA panel to account for the weaker intensity of staining of SYBR Gold [15]. **(B–C)** Purified Smc6 was incubated with ssDNA oligonucleotides **(B)** and dsDNA oligonucleotides **(C)** of various lengths (30, 45, 60, 75 nt/bp) for 30 min at 30°C. Protein-DNA complexes were resolved on a 2% agarose gel and visualized after UV exposure as described above. In all panels, the asterisk marks the position of the Smc6-DNA complexes, whereas arrows mark the positions of free DNA.

Figure 3. Smc6 binding to ssDNA occurs at physiological concentrations of salts.



(A–B) Purified Smc6 was incubated with dsDNA (A) and ssDNA (B) in the presence of increasing concentrations of salt. The resulting Smc6-dsDNA complexes were resolved by electrophoresis and visualized as before. Note that in (B), the panel on top is a short exposure of the region of the gel containing the Smc6-ssDNA complexes, whereas the bottom panel shows a longer exposure of the whole gel.

Figure 4. Modulation of Smc6 activity by nucleotides.



(A–B) Purified Smc6 was incubated with dsDNA (A) and ssDNA (B) in the presence or absence of 1 mM ATP, and processed for EMSA analysis, as previously described. A longer exposure of the region of the gel containing free ssDNA is shown below the main panel. (C) Smc6 was incubated with various nucleotides for 30 min and centrifuged at high speed. The supernatant and pellet fractions were resolved by SDS-PAGE and visualized by western-blotting.

4.0) Effet de la dimérisation sur la liaison à l'ADN de Smc5 et Smc6

The Smc5-Smc6 heterodimer associates with DNA through several independent binding domains

Marc-André Roy, Thillaivillalan Dhanaraman and Damien D'Amours*

Institute for Research in Immunology and Cancer
and Département de Pathologie et Biologie Cellulaire
Université de Montréal
P.O. Box 6128, Succursale Centre-Ville
Montréal, QC, H3C 3J7
CANADA

*Corresponding author

Key words: Smc5-6 complex, DNA binding protein, DNA repair, homologous recombination, chromosome, mitosis

4.1) Abstract

The Smc5-6 complex is required for the maintenance of genome integrity through its functions in DNA repair and chromosome biogenesis. However, the specific mode of action of Smc5 and Smc6 in these processes remains largely unknown. We previously showed that individual components of the Smc5-Smc6 complex bind strongly to DNA as monomers, despite the absence of a canonical DNA-binding domain (DBD) in these proteins. How heterodimerization of Smc5-6 affects its binding to DNA, and which parts of the SMC molecules confer DNA-binding activity is not known at present. To address this knowledge gap, we characterized the functional domains of the Smc5-6 heterodimer and identify two DBDs in each SMC molecule. The first DBD is located within the SMC hinge region and its adjacent coiled-coil arms, while the second is found in the conserved ATPase head domain. These DBDs can independently recapitulate the substrate preference of the full-length Smc5 and Smc6 proteins. We also show that heterodimerization of full-length proteins specifically increases the affinity of the resulting complex for double-stranded DNA substrates. Collectively, our findings provide critical insights into the regulation and structural requirements for effective binding of the Smc5-6 complex to DNA repair substrates *in vitro* and in live cells.

4.2) Introduction

To ensure organism fitness and genetic inheritance, cells must maintain their genomic stability during proliferation. Genome integrity relies on several cellular pathways that together orchestrate key aspects of chromosome biogenesis, such as DNA repair, DNA replication and chromosome segregation [1]. DNA repair pathways play a key role in the preservation of chromosome integrity when cells experience genotoxic lesions [2], whereas the replication and segregation pathways facilitate faithful duplication and transmission of the genome under normal proliferative conditions [3, 4]. Members of the Structural Maintenance of Chromosome (SMC) family of proteins are central effectors of the segregation and DNA repair machineries, and as such contribute to critical activities required for the maintenance of genome stability.

SMC proteins are found in all domains of life [5]. Prokaryotic genomes encode a single SMC protein that operates as a homodimer. In contrast, eukaryotes express at least 6 SMC family members. Each SMC protein interacts with one other SMC family member, as well as with additional non-SMC elements to form 3 large complexes: the cohesin, the condensin and the Smc5-6 complexes [6-8]. The cohesin and condensin complexes play key roles in sister chromatid cohesion and chromosome condensation, respectively [7, 8]. They are also involved in DNA repair. In particular, cohesin is implicated in DNA double-strand break (DSB) repair, whereas condensin is involved in DNA single-strand break repair [9, 10]. The exact functions of the Smc5-6 complex are not completely understood, but include important roles in DNA repair by homologous recombination, restart of collapsed

replication forks, maintenance of telomeres homeostasis, and rDNA stability [6, 11].

Inactivation of the Smc5-6 complex in *S. cerevisiae*, *S. pombe*, chicken and human cells leads to faulty homologous recombination between sister chromatids [12]. Genetic analyses place the Smc5-6 complex in the same pathway as cohesin for DSB repair [12, 13]. The function of the cohesin complex is to maintain proximity between sister chromatids [10]. To accomplish this function, two subunits of the cohesin complex must be sumoylated (Scc1 and Scc3), and the enzyme responsible for this sumoylation is the Nse2/Mms21 component of the Smc5-6 complex [13]. Another function of the Smc5-6 complex during DSB repair occurs specifically at the rDNA locus, where the complex antagonizes the activity of Rad52 in repair reactions [14]. Indeed, when DSBs are formed at the rDNA locus (in the nucleolus), homologous recombination is initiated but completion is prevented because Rad52 is excluded from the nucleolus in a Smc5-6-dependent manner [14]. This process relies on Rad52 sumoylation, but does not seem to involve the sumo ligase activity of Nse2/Mms21. In addition to its Rad52-specific DNA repair role in the nucleolus, the Smc5-6 complex is also required for completion of rDNA locus replication during S phase [15]. The exact function of the Smc5-6 complex during this process is unknown. Finally, the Smc5-6 complex is implicated in telomere homeostasis by the alternative lengthening of telomeres (ALT) pathway [16]. The complex regulates this process by Nse2/Mms21-dependent sumoylation of the shelterin/telosome components. This post-translational modification promotes the recruitment of telomeres to promyelocytic leukemia bodies, thereby stimulating the ALT pathway [16].

The Smc5-6 complex, like the cohesin and condensin complexes, must interact with DNA to accomplish its functions. It is therefore important to understand the nature of its DNA-binding activity to better understand how Smc5-6 functions are promoted in cells. It has been established that cohesin and condensin can associate with DNA in a topological manner [17, 18]. This binding mode allows one or two pieces of DNA to enter into a ring formed by the cohesin or condensin complexes. This ring-like shape is formed via a ternary complex composed of distinct SMC proteins and a member of the kleisin family of proteins [19, 20]. SMC proteins interact with the kleisins via their ATPase domains, whereas additional non-SMC components associate with the tripartite ring and provide ancillary functions to their respective complexes [6-8]. It is unclear whether a topological mode of DNA binding –like that of cohesin and condensin– would be consistent with Smc5-6 complex functions in DSB repair. Indeed, the ability of SMC ring complexes to slide along DNA molecules during the repair process might allow the Smc5-6 complex to “fall off” or dissociate from DNA at the position of the DSB [17]. If this were to occur, cells would not only lose the SMC-enforced proximity between damaged and undamaged DNA molecules, but also the presence of the Smc5-6 complex at the site of the lesion, which is unlikely to promote effective DNA repair. It is thus conceivable that Smc5-6 proteins could maintain physical proximity between distinct chromosomal/DNA regions via a non-topological mechanism, as has been recently observed with RecN, a bacterial SMC-like protein [21].

We previously showed that Smc5 and Smc6 monomers can bind to nucleic acids with a clear preference for single-stranded DNA (ssDNA) [22, 23]. We are now interested in

defining which regions of Smc5 and Smc6 molecules confer this DNA-binding activity. To answer this question, we divided the SMC proteins according to their characteristic parts – hinge, coiled-coil and ATPase head domains– and characterized the biochemical properties of these functional domains. We reveal herein the existence of two distinct DNA-binding domains on each SMC protein. Moreover, we show that these DNA-binding domains have a DNA substrate preference similar to that of full-length Smc5 and Smc6, and that dimerization of Smc5-6 modulates the DNA-binding properties of the complex.

4.3) Materials and Methods

Plasmids for Smc5-6 overexpression

The boundaries of Smc5 and Smc6 head domains, coiled-coil and hinge regions were determined using PSIPRED [24]. DNA fragments encoding the functional regions of Smc5 or Smc6 were amplified by PCR and cloned into pETDuet-1, pET28a, pET41a or pET30a vectors (Novagen) for expression in *Escherichia coli*. The Smc5 fragments were expressed as fusion proteins with a carboxy-terminal nona-histidine tag, whereas Smc6 fragments were fused at their amino-terminus with the Strep-TagII sequence. The bipartite ATPase head domains of Smc5 and Smc6 were amplified by PCR, and both parts were connected during the amplification procedure with a primer encoding a 14-residue flexible linker, as done previously for Smc1 and Smc3 [25]. These constructs were then fused to a tandem affinity purification tag (3xStrep-TagII and 9xHIS; STH) at their carboxy-termini and subcloned downstream of the *GAL1* promoter in a 2 μ *URA3 leu2-d* containing plasmid for expression in

S. cerevisiae. The detailed amino acid positions of each region used in this study are listed in Table 1.

DNA binding experiments

DNA substrates used in EMSA experiments were phiX174 (ssDNA substrate; 5386 bp) and EcoRI-digested pBluescript II KS+ (dsDNA substrate; 2961 bp). At a given molar fold-excess of Smc5 heterodimer-to-DNA, one may consider the nucleotide content of ss and dsDNA-binding reactions to be similar since the ssDNA substrate is approximately twice the size of the dsDNA substrate, but the later contains twice the nucleotide content per unit of length because of its double-stranded nature. The DNA binding properties of Smc5-6 proteins were determined by electrophoretic mobility shift assay (EMSA), essentially as described previously [22, 23]. HJ and splayed Y structures were assembled as described previously, with minor modifications [26]. Four complimentary oligonucleotides (HR1, HR2, HR3 and HR4; for HJ) and 2 partially complimentary oligonucleotides (HR1 and HR2; for splayed Y) were annealed in 10 mM Tris-HCl (pH 8.5) at a concentration of 5 µM. The mixtures were incubated for 2 min at 95 °C, followed by 10 min at 65 °C, 10 min at 37 °C, and 10 min at room temperature (in total volume of 100 µl). The entire mixtures were separated on a 2% TAE agarose gel, and the corresponding bands (HJ and Y) were excised from the gel. DNA was recovered using a standard gel extraction procedure (QIAquick® gel extraction; Qiagen). An aliquot from this final sample was run on 10% native acrylamide gel to confirm the purity and integrity of the HJ and Y DNA structures. Binding of Smc5-6 HS to structured DNA molecules was determined by EMSA saturation experiments in Holliday junction

buffer (10 mM Hepes pH 7.5, 50 mM NaCl, 7 mM MgCl₂, 20% glycerol, and 2 mM 2-ME). Protein-DNA complexes were visualized after electrophoresis using the 6-FAM fluorophore conjugated to the 5' end of the HR1 and HR2 oligonucleotides. ssDNA substrates used in EMSA experiments were as described previously [22]. Treatment of nucleoprotein complexes with proteinase K was performed as previously described with minor modifications [27].

Protein expression and purification in E. coli

All hinge domain-containing proteins were expressed in Rosetta 2 DE3 pLys cells (Novagen) [28]. Bacterial cultures were grown at 37 °C to an A₆₀₀ of 0.6 and induced to express recombinant proteins by addition of 1 mM isopropyl β-thiogalactopyranoside for 6 h at 20 °C. Cells were harvested and lysed in buffer A (50 mM K₂HPO₄/KH₂PO₄pH 8.0, 50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 500 mM NaCl, 10% glycerol, 2 mM 2-mercaptoethanol (2-ME), 0.2% Triton X-100 supplemented with phosphatase and protease inhibitor cocktail set IV (EMD) and 100 µg/mL lysozyme). After 30 min of incubation on ice, cells were sonicated (3 pulses of 10 sec at output level 4 using a Misonix Sonicator 3000). The crude lysates were centrifuged at 50,000 g for 30 min at 4 °C. Soluble proteins were collected and incubated with Ni-NTA agarose resin (Qiagen) for 1 h. The resin was washed with 10 column volumes (CVs) of buffer B (25 mM K₂HPO₄/KH₂PO₄, pH 8.0, 500 mM NaCl, 10% glycerol, 0.2% Tween 20, 2 mM 2-ME) supplemented with 20 mM imidazole and eluted with 3 CVs of NS buffer supplemented with 500 mM imidazole. The eluates were then diluted 3-fold with buffer NS (25 mM K₂HPO₄/KH₂PO₄, pH 8.0, 750 mM NaCl, 5% glycerol, 0.7% Tween 20) before loading

on a *Strep-Tactin*[®] column (GE Healthcare). The column was washed with 10 CVs of NS buffer and eluted with 5 CVs of NS buffer supplemented with 2 mM desthiobiotin. The eluates were concentrated by ultrafiltration using Amicon Ultra filtration units (10K NMWL; Millipore) and further purified by size exclusion chromatography on a Superose 6 10/300 column (GE Healthcare) in buffer C (25 mM K₂HPO₄/KH₂PO₄, pH 8.0, 500 mM NaCl, 10% glycerol, 0.2% Tween 20, 2 mM 2-ME, 1 mM EDTA). The final fractions that contained purified proteins were concentrated to ~2 mg/mL using Amicon Ultra filtration units (10K NMWL; Millipore), frozen on dry ice and stored at -80 °C. To purify Smc5 monomeric fragments, we used the same procedure with the following modifications. Proteins were purified by single-step Ni-NTA chromatography, buffer A contained 150 mM NaCl, and buffer C contained 750 mM NaCl. To purify Smc6 monomeric fragments, we used the same procedure as described above with the following modifications. Proteins were purified using single-step *Strep-Tactin*[®] chromatography, buffer A contained 150 mM NaCl, and buffers B and C contained 750 mM NaCl.

Protein expression and purification in yeast

The Smc5 head domain was expressed in yeast strain D3596 using standard procedures [29]. Protein expression was induced for 4 h with galactose (2% final) in a 1 L yeast culture. The Smc5 head domain-overexpressing cells were resuspended in 4 mL of lysis buffer (100 mM K₂HPO₄/KH₂PO₄, pH 8.0, 50 mM Tris-HCl pH 8.0, 50 mM NaCl, 5% glycerol supplemented with phosphatase and protease inhibitor cocktail set IV (EMD)) and lysed as previously described [29]. After lysis, salt was adjusted to 1 M NaCl, glycerol was adjusted to 5%, and

the lysate was centrifuged at 16,500 g at 4 °C for 15 min. The soluble proteins were collected, and the lysate pH was adjusted to 8.0. The lysate was then diluted 2-fold with buffer D (25 mM K₂HPO₄/KH₂PO₄, pH 8.0, 500 mM NaCl, 5% glycerol and 0.7% Tween 20) and incubated with Ni-NTA agarose resin (Qiagen) for 1 h. The resin was washed with 10 CVs of buffer D supplemented with 20 mM imidazole and eluted with 3 CVs of buffer D supplemented with 250 mM imidazole. The eluate was then diluted 10-fold with buffer Q1 (Tris-HCl at pH 8.0, 10% glycerol, 0.7% Tween-20, 2 mM 2-ME, 1 mM EDTA) and passed through a Q-Sepharose FF column[°] (GE Healthcare). The flow-through was then loaded on a *Strep-Tactin*[°] column (GE Healthcare), washed with 10 CVs of buffer E (25 mM K₂HPO₄/KH₂PO₄, pH 8.0, 750 mM NaCl, 15% glycerol, 0.2% Tween 20, 2 mM 2-ME, 1 mM EDTA) and eluted with 5 CVs of buffer E supplemented with 2 mM desthiobiotin. The final fractions containing purified proteins were concentrated to ~1 mg/mL with Amicon Ultra filtration units (10K NMWL; Millipore), frozen on dry ice and stored at -80 °C.

For the Smc6 ATPase head domain, overexpression and cell lysis were performed exactly as described above using yeast strain D3862. After centrifugation, the soluble proteins were collected, and the lysate pH was adjusted to 8.0. The lysate was then diluted 2 fold with buffer F (25 mM K₂HPO₄/KH₂PO₄, pH 8.0, 10 mM Tris-HCl at pH 8.0, 500 mM NaCl, 10% glycerol, 0.2% Tween 20, 2 mM 2-ME) and incubated with Ni-NTA agarose resin (Qiagen) for 1 h. The resin was washed with 10 CVs of buffer F supplemented with 20 mM imidazole and eluted with 3 CVs of buffer F supplemented with 500 mM imidazole. The eluate was then diluted 3-fold with buffer F and loaded on a *Strep-Tactin*[°] column (GE Healthcare), washed

with 10 CVs of buffer F and eluted with 5 CVs of buffer F supplemented with 2 mM desthiobiotin. Next, the eluate was diluted 10-fold with buffer SP- (50 mM K₂HPO₄/KH₂PO₄, pH 8.0, 10% glycerol, 0.2% Tween 20, 2 mM 2-ME) and loaded on an SP-Sepharose FF column[®] (GE Healthcare), washed with 10 CVs of buffer SP1 (buffer SP- containing 50 mM NaCl) and eluted with a linear gradient of 10 CVs of buffer SP1 and buffer SP2 (buffer SP- containing 1 M NaCl). The protein was eluted in a fraction containing approximately 130 mM NaCl. The final fractions containing purified proteins were concentrated to ~0.5 mg/mL with Amicon Ultra filtration units (10K NMWL; Millipore), frozen on dry ice and stored at -80 °C.

Reconstitution of full-length Smc5-6 heterodimers

To reconstitute the FL Smc5-6 heterodimer, individual subunits were expressed and purified as previously described [22, 23], with the exception that we used a StrepTrap[®] column (GE Healthcare) instead of StrepTactin[®]. After the StrepTrap[®] chromatography, we mixed 5 mL of the Smc6 eluate with 150 µL of the Smc5 eluate, and supplemented this mixture with phosphatase and protease inhibitor cocktail set IV (EMD). After overnight incubation at 4 °C, the proteins were concentrated via ultrafiltration using Amicon Ultra filtration units (10K NMWL; Millipore) and complexes were separated from monomeric subunits by size exclusion chromatography on a Superose 6 10/300 column (GE Healthcare) in buffer G (25 mM K₂HPO₄/KH₂PO₄, pH 8.0, 750 mM NaCl, 15% glycerol, 0.2% Tween 20, 2 mM 2-ME, 1 mM EDTA). The final fractions containing purified proteins were concentrated

to ~150 ng/mL with Amicon Ultra filtration units (10K NMWL; Millipore), frozen on dry ice and stored at -80 °C.

4.4) Results

Generation of Smc5-6 heterodimers

To better understand how Smc5 and Smc6 function *in vivo*, we first wanted to determine the minimal regions of these proteins that are necessary and sufficient for binding to DNA. To this end, we divided each SMC protein into three distinct regions corresponding to the domains characteristic of SMC proteins; namely the hinge, the coiled-coil and the ATPase head domains [5]. In addition to the monomeric ATPase head domains (described below), we generated four different Smc5-Smc6 heterodimer complexes: the hinge short (HS; Smc5 residues 428-to-675, Smc6 residues 486-to-732), the hinge medium (HM; Smc5 residues 300-to-803, Smc6 residues 350-to-868), the hinge long (HL; Smc5 residues 215-to-885, Smc6 residues 260-to-970), and full-length proteins (FL). Figure 1a shows a schematic representation of the different heterodimers we created (with coloured portions corresponding to the region included in each construct). The FL Smc5-6 proteins were purified from yeast as described previously [22, 23], whereas the protein fragments were overexpressed in bacteria either in combination or individually, and later reconstituted to form the heterodimers by sequential purification using affinity tags unique to each subunit. Specifically, all dimers were purified using a combination of nickel-chelate and *Strep-Tactin*® chromatography. Size exclusion chromatography on Superose 6 or 12 columns was performed as the final purification step to confirm the molecular mass and

stability of the reconstituted complexes (Fig. 1c). Like other SMC complexes, the Smc5-6 FL heterodimer eluted from the exclusion column over a range of fractions corresponding to a higher molecular mass than predicted from sequence alone (~267 kDa for the heterodimer), a behaviour that is typical of SMC family proteins and that reflects both the elongated shape and the diversity of configuration of coiled-coil arms in SMC complexes [30, 31]. Using the procedures described above, all heterodimers were purified to ≥90% homogeneity, as judged by Coomassie brilliant blue-staining after SDS-PAGE (Fig. 1d).

Effects of dimerization on Smc5-6 DNA-binding activity

Next, we determined the relative affinities of the Smc5-6 heterodimers for ssDNA and dsDNA. Our initial analysis focused on the full-length (FL) version of the Smc5-6 heterodimer since DNA-binding activity is mostly or entirely conferred by SMC components in several complexes of this family [32, 33]. We generated DNA binding isotherms from saturation binding experiments using the electrophoretic mobility shift assay (EMSA) and increasing concentrations of Smc5-6 heterodimer (*i.e.*, as previously performed with the monomeric proteins [22, 23]). The dissociation constant (K_d) of Smc5-6 for ssDNA and dsDNA substrates was then calculated from saturation binding curves. The data that we previously obtained for Smc5 alone are included on the same graph for comparison [22]. As expected, the affinity for ssDNA was similar between the Smc5-Smc6 heterodimer and Smc5 monomer (*i.e.*, 40 ± 3 nM vs. 22 ± 3 nM; Fig. 1e). In striking contrast, the heterodimer and monomer versions differed significantly in their affinity for dsDNA. Indeed, the formation of the heterodimer significantly increased the affinity of Smc5-6 FL for dsDNA

relative to the Smc5 monomer alone (*i.e.*, 10 ± 2 nM vs. 48 ± 3 nM; Fig. 1f). These results indicate that dimerization positively affect the binding of the Smc5-6 complex to dsDNA substrates. This observation is physiologically important since the Smc5 protein has been shown to function outside of the Smc5-6 holoenzyme during mitosis [34], a period when the other components of the complex are also excluded from chromosomes *in vivo* [35-38].

Having established a benchmark for the DNA-binding activity of the FL heterodimer, we next conducted additional EMSA experiments to determine whether shorter versions of the Smc5-Smc6 complex have a similar DNA binding activity compared to the FL heterodimer. We focused our analysis on hinge-containing Smc5-6 fragments since this region is required for dimerization (*i.e.*, ATPase head domains are analyzed separately below). As before, a fixed concentration of DNA substrate (ssDNA or dsDNA) was incubated with increasing concentrations of the various Smc5-6 heterodimers. The resulting reactions were loaded on an agarose gel to separate the free DNA from the Smc5-6-bound form. As shown in Figure 2a, all heterodimers bound to ssDNA with similar affinity, based on the observation that a heterodimer-to-DNA molar ratio of 25 fold is sufficient in all cases to shift the free ssDNA into the gel. However, it is apparent from the different positions of DNA- SMC complexes after electrophoretic separation that the DNA-binding mode is unlikely to be the same for all heterodimers. For instance, the association of the HS construct with DNA generated a novel band migrating above the free DNA but still near the bottom of the gel, irrespective of the protein concentrations used (Fig. 2a; lanes 2-4). This intermediate was not formed in DNA-binding reactions with larger heterodimers. Elongating the length

of the coiled-coil region in the hinge fragments progressively slowed the migration of the DNA-bound heterodimers, as evidenced by the formation of a smear near the top of the gel at low heterodimer-to-DNA molar ratios, and the retention of the nucleoprotein complexes at the origin of the gel at high Smc5-6-to-DNA molar ratios (Fig. 2a; lanes 5, 8 and 12). The low mobility of the HM and HL constructs observed in these EMSA experiments is very similar to the behavior of other DNA repair factors acting on ssDNA substrates (e.g., Xrs2, RPA, and Rad55-57 [27, 39, 40]) in comparable gel shift assays. Taken together, these experiments indicate that the Smc5-6 hinge domain contains a *bona fide* ssDNA-binding activity.

We also tested the ability of the heterodimers to bind double-stranded substrates and found that the HS heterodimer bound dsDNA with a much lower affinity than the larger Smc5-6 fragments. Even at 90-fold molar excess of protein-to-DNA, the HS heterodimer did not fully shift the free dsDNA in the gel following electrophoresis (Fig. 2b; lane 4). In contrast, HM and HL heterodimers exhibited strong dsDNA-binding activity under these conditions (and even at lower protein concentrations; Fig 2b, lanes 6 and 9). Interestingly, HM and HL heterodimers failed to completely bind dsDNA at protein-to-DNA ratios that were sufficient to fully shift ssDNA (compare lanes 6 and 9 in Fig. 2a with lanes 5 and 8 in Fig. 2b). The inability of Smc5-6 HM and HL heterodimers to fully bind dsDNA under conditions that lead to full binding of single-stranded substrates suggests that the low electrophoretic mobility of the heterodimer-ssDNA complexes is not due to unspecific protein aggregation in EMSA experiments. Indeed, from a nucleotide-content standpoint,

ss and dsDNA-binding reaction conditions are approximately equivalent (when expressed as molar ratio of DNA substrate relative to Smc5-6 heterodimer; see Methods) and yet only ssDNA associated efficiently with Smc5-6 dimers at protein-to-DNA molar ratios under 30 (compare lanes 3, 6, and 9 in Fig. 2a with lanes 2, 5, and 8 in Fig. 2b). If the binding reactions were driven by non-specific aggregation, one would predict that Smc5-6 should bind equally well to ssDNA and dsDNA under identical chemical (*i.e.*, total nucleotide content) conditions. Moreover, the formation of discrete high mobility ssDNA-protein complexes in EMSA experiments involving the HS heterodimer (Fig. 2a; lanes 2-4) demonstrates that this construct contains the minimal domain sufficient for effective ssDNA binding. However, the presence of additional coiled-coil sequence adjacent to the hinge domain appears necessary to mediate robust binding to double-stranded substrates.

Minimal size of DNA substrates bound by Smc5-6 heterodimers

Since the relative affinity of the HS heterodimer for ssDNA was similar to that of the FL heterodimer, we used the HS heterodimer to determine the minimum ssDNA length required for stable DNA association. To address this question, we used small fluorescent oligonucleotides ranging from 15 to 60 nts in size as substrates in EMSA experiments. Using a similar approach, we previously showed that FL Smc5 and Smc6 monomers can bind stoichiometrically to oligonucleotides of ~45 nts in length [22, 23]. Consistent with our previous experiments, we observed that substrates of 15 and 30 nts in length interacted weakly with Smc5-6 heterodimers at protein-to-DNA molar ratios ≤ 1 (Fig. 2c; lanes 1-3 and 6-8), and that high concentrations of HS dimer were required to fully shift the DNA away

from the unbound position in the gel (*i.e.*, arrow in Fig. 2c; lanes 4-5 and 9-10). In contrast, when DNA substrate size was increased to 45 and 60 nts, free DNA was no longer observed at the bottom of the gel at equimolar ratios of substrate and heterodimer (Fig. 2c; lanes 14 and 19). Interestingly, no specific DNA signal was detected in the gel under these conditions, suggesting that Smc5-6 complexes formed multiple nucleoprotein species that are spread out throughout the length of the gel, thereby preventing direct visualization of individual nucleoprotein species (as previously observed [27, 41]). To confirm this interpretation and to exclude the presence of a contaminating nuclease activity in the HS heterodimer preparation (as a possible explanation for the disappearance of the DNA signal in our EMSA experiments), we treated a fraction of the DNA-binding reaction with a protease and loaded it on a separate gel [27]. After migration, the gel exhibited the same amount of free DNA under all conditions tested (Fig. 2c; diamond band). This observation suggests that the association of the Smc5-6 HS fragment to short ssDNA oligonucleotides creates multiple nucleoprotein species that migrate at different positions after electrophoresis. Consistent with this, further increasing the amount of Smc5-6 heterodimer in the binding reaction saturates the substrates and caused a re-appearance of the 45 and 60 nts ssDNA fragments on top of the gel (Fig. 2c; lanes 15 and 20). Importantly, reversal of the DNA shift upon protease treatment indicates that the low mobility DNA complexes are not due to protein-independent DNA aggregation or covalent linkages created during the binding reaction [42]. Thus, we conclude that the HS heterodimer can bind to DNA substrates as short as 45 nts in length, which fully recapitulates the DNA-binding behavior of the FL Smc5 protein in this regard [22]. Based on its specific affinity and length

requirements for ssDNA binding, we consider that the Smc5-6 HS heterodimer contains the minimal region necessary and sufficient to mediate the DNA-binding activity of the native Smc5-6 proteins.

Smc5-6 heterodimers bind to structured DNA molecules

The involvement of the Smc5-6 complex in DSB repair raises the intriguing possibility that this complex might interact directly with Holliday junctions (HJ) and other structured DNA substrates generated during HR reactions. To address this possibility, we constructed a synthetic HJ and a splayed Y structure (deriving from the HJ) using fluorescently labeled oligonucleotides [26]. Remarkably, incubation of these structured DNA substrates with the Smc5-6 HS heterodimer led to the quantitative formation of retarded nucleoprotein species in EMSA experiments (Fig. 3). The affinity of Smc5-6 for these structured DNA substrates was high, with most DNA structures associating with HS heterodimers at equimolar ratios of protein and DNA substrate. Nucleoprotein complexes formed at low Smc5-6 heterodimer-to-DNA ratios migrated at intermediate positions in the gel (Fig. 3; lanes 2-4 and 7-9), whereas increasing the relative amount of Smc5-6 HS dimer led to the formation of reduced-mobility complexes at or near the origin of the gel (Fig. 3; lanes 5 and 10). Taken together, these observations indicate that Smc5-6 heterodimers efficiently bind to structured DNA molecules typically created during the HR repair process.

Smc5 monomeric domains: Importance of the coiled-coil and ATPase head regions for DNA-binding activity

Having established the DNA-binding properties of Smc5-6 fragments in a heterodimer configuration, we next wanted to know whether the Smc5 monomers would have different DNA-binding characteristics compared to heterodimers. Furthermore, we wanted to study the impact of the ATPase head on the overall DNA-binding activity of their SMC complex. To achieve this, the functional domains of Smc5 were purified to apparent homogeneity in monomer form (as described above; Fig. 4b), and their DNA-binding properties characterized by EMSA experiments.

All constructs tested bound ssDNA, but to different extents. For instance, the Smc5 HS DNA-binding activity was weak relative to either the Smc5-6 HS heterodimer or the HM and HL monomeric variants of Smc5 (Fig. 4c; lanes 2 to 4). The EMSA experiments also revealed that the DNA binding properties of the HM and HL fragments were comparable, thereby arguing that the minimal region necessary for Smc5 binding to ssDNA as a monomer is located within the HM fragment (Fig. 4c; lanes 5-10). Interestingly, we noticed that we needed ~2-fold more Smc5 HL protein than FL to fully bind the ssDNA (Fig. 4c; lanes 10 and 12), which argues that the HL construct does not contain all the DNA-binding activity of the native protein. Similar results were obtained with dsDNA substrates in EMSA experiments performed with Smc5 monomeric fragments (Fig. 4d). In particular, we note that even the HM monomer of Smc5 associated somewhat weakly to dsDNA compared to the HL and FL proteins (Fig. 4d; lanes 7 vs 11 and 14). Taken together, these results reveal

that the major DNA-binding site in the Smc5 monomer is located in the hinge domain and the adjacent coiled-coil region. Increasing the length of coiled-coil arm beyond that contained within the HM construct did not confer additional ssDNA binding ability, but did have a positive impact on dsDNA association.

The difference in the strength of the ssDNA-binding activity of the FL and HM versions of Smc5 described above suggests that FL Smc5 might contain more than one independent DNA-binding region. Since the hinge-containing fragments lack the ATPase domain of Smc5, we wondered whether this catalytic domain might also possess DNA-binding activity. To address this possibility, we constructed a monomeric version of Smc5's bipartite ATPase head domain (Smc5hd) by fusion of the amino- and carboxy-terminal parts of the protein using a short flexible linker, as previously done for the SMC components of the cohesin complex (Fig. 5a) [25]. After overexpression in yeast, the protein was purified using a combination of affinity and ion exchange chromatography steps (Fig. 5b). We then monitored the putative DNA-binding activity of the Smc5hd by EMSA experiments. Surprisingly, we observed a specific DNA-binding activity towards ssDNA, but not dsDNA, with the purified Smc5hd (Fig. 5c). The protein-to-DNA molar ratio necessary to fully shift the free ssDNA into the gel was 175, which is approximately 7-fold greater than the ratio required when using FL Smc5 protein (Fig. 5c; lane 6). This result prompted us to determine whether ATP might affect Smc5hd DNA-binding activity. To ensure that we can detect both positive or negative effects of ATP on Smc5hd binding to DNA, we used throughout the following series of experiment a Smc5hd:DNA molar ratio that results in

partial DNA shifting when ATP is omitted from the EMSA reaction (*i.e.*, ~60%, as previously done with the FL protein [22]). Interestingly, supplementing binding reactions with 2 mM ATP increased the DNA-binding activity of Smc5hd by 30% relative to control reactions (Fig. 5d). This stimulatory activity required ATP hydrolysis since no effect was observed when using the non-hydrolyzable ATP analog –ATPyS– in binding reactions (Fig. 5d; lanes 6 vs 10). Taken together, these experiments reveal that Smc5 contains at least two independent DNA-binding regions, each located at different ends of the folded SMC rod structure.

DNA-binding activity of Smc6 monomers

We next explored the biochemical properties of Smc6 functional domains in their monomeric forms. Using a similar strategy to that used with Smc5 fragments, several variants of Smc6 were constructed to study the DNA-binding activity of its functional domains (Fig. 6a-b). Except for the Smc6 HS variant, all proteins could be purified to near homogeneity as soluble monomers. Since Smc6 HS was not soluble, we did not include it in our functional analyses.

As before, we used EMSA experiments with ssDNA and dsDNA to determine the DNA-binding activity of the Smc6 variants. Overall, the ssDNA binding affinities were similar when comparing the HM and HL constructs of Smc6 (Fig. 6c; lanes 2-7). However, a clear difference was apparent with regards to the nature of the protein-DNA complex observed in the gel after interaction of HM and HL fragments with ssDNA. Specifically, the HM nucleoprotein complexes migrated as smear in the EMSA experiment, whereas analogous

complexes involving Smc6 HL migrated close to, or at the origin of the gel (Fig. 6c; lanes 3 and 6). This result is similar to that obtained with Smc5 fragments and suggests that extending the length of SMC protein coiled-coil arms causes a more pronounced gel retardation in EMSA experiments. Compared with the FL protein, ~1.5 fold more Smc6 HL protein was needed to fully bind the free ssDNA (Fig. 6c; lanes 6 vs 11). This observation lends credence to the notion that Smc6 contains more than one DNA-binding domain. For dsDNA, the DNA-binding activity of both HM and HL was weak (Fig. 6d; lanes 4 and 7), and significantly more of the HL or HM proteins were required to fully bind dsDNA compared with FL Smc6 (Fig. 6d; lanes 3, 6 vs 10).

Our previous analysis of FL Smc6 revealed a small, but reproducible, increase in DNA-binding activity when the protein was incubated with ATP [23], thereby suggesting a potential role for the ATPase domain of the protein in DNA-binding activity. To test this hypothesis, we overexpressed the Smc6 ATPase head domain in yeast (Smc6hd, Fig. 7a), and we purified the protein to greater than 95% homogeneity (Fig. 7b). As expected, Smc6hd bound ssDNA extensively in EMSA experiments, but interacted weakly with double-stranded substrates under similar binding conditions (Fig. 7c). Approximately 3.3 fold more Smc6hd was necessary to fully bind free DNA when compared to the FL protein. Supplementing 2 mM ATP to the DNA-binding reaction stimulated ssDNA binding by 20% (Fig. 7d; lanes 2 and 6), and substitution of ATP with ATPyS abolished the stimulation (Fig. 7d; lanes 7-10). Taken together, these results indicate that Smc6 is able to associate with

DNA substrates via both its ATPase and hinge domains, and that this is a conserved property of the SMC components of Smc5-6 complexes.

4.5) Discussion

This study provides critical insights into the mode of action and structural requirements for effective DNA binding by the Smc5-6 complex. Using a series of functional domain fragments, we reveal how the Smc5 and Smc6 proteins can interact with their DNA substrates via two distinct DNA-binding domains on each SMC molecule. The combinatorial use of these individual domains in Smc5-6 complexes is likely to confer multivalent DNA binding properties and highly resistant DNA association *in vivo*. Consistent with this view, we show that formation of the Smc5-Smc6 heterodimer increases the affinity of the resulting complex specifically for dsDNA substrates. Finally, we present evidence that suggests a putative role for ATP hydrolysis in the regulation of SMC protein association with DNA. Collectively, these discoveries have major implications on our understanding of how the Smc5-6 complex interacts with chromosomal DNA substrates in living cells, and how these interactions might contribute to effective DNA repair and chromosome segregation *in vivo*.

From a functional standpoint, the structure-function analysis of Smc5-6 presented herein has revealed the existence of at least two DNA-binding regions in each of these proteins. The first region is located in the hinge domain and adjacent coiled-coil arm sequences, whereas the second DNA-binding region is located in the ATPase head domain

of the protein. This bivalent DNA-binding activity is not typical of all SMC proteins. Indeed, with the notable exception of *T. maritima* SMC [43], all bacterial SMC members bind DNA substrates via either their ATPase head or hinge domains, but not both. For instance, the two most studied prokaryotic SMC proteins –the MukB protein from *E. coli* and *Bacillus subtilis* SMC (BsSMC)– have been shown to contain a single DNA-binding domain located at the junction between the ATPase and coiled-coil regions [44] and at the hinge domain, respectively [45]. The situation is more complex in the case of eukaryotic SMC proteins. Smc1 and Smc3, the SMC components of the cohesin complex, can bind to DNA via the extreme C-terminal portion of their ATPase domains [46, 47] as well as through their hinge domains [48-50], whereas the DNA-binding activity of the SMC subunits of the condensin complex appears to reside primarily in their hinge domains [33, 49]. Interestingly, both the hinge- and ATPase head-mediated DNA interactions of cohesin's SMC components show much higher affinity for dsDNA than for ssDNA [46-48], a preference that is opposite to that of the homologous domains in Smc5 and Smc6. This may reflect the primary function of cohesin in mediating sister chromatid cohesion, which does not involve ssDNA intermediates associating typically with DNA repair reactions. Thus, with regards to its high affinity for ssDNA substrates, the Smc5-6 complex resembles more the Smc2 and Smc4 components of condensin and of bacterial SMC complexes [49, 51, 52]. Another key difference between the cohesin and Smc5-6 complexes is the fact that Smc1 and Smc3 hinge regions require dimerization to mediate DNA binding [48], while Smc5 and Smc6 hinges bind DNA substrates with high affinity both as monomers and as a heterodimer. The ability of Smc5-6 to bind DNA segments as a monomer is consistent with the fact that Smc5

exerts some of its functions in the absence of Smc6 and other components of the complex during mitosis [34].

It is worth mentioning that ATP seems to have distinct effects on Smc5 DNA-binding activity depending on whether the whole protein or only the ATPase head domain are analyzed. The presence of dual DBDs in native Smc5 may explain this difference. Indeed, it has been previously noted that binding of DNA substrates near the ATPase head domain of Rad50 –a SMC-like repair factor– can induce mesoscale conformational changes at the other end of the molecule (i.e., in a region corresponding to the hinge domain in Smc5-6) [53]. In light of this, it is possible that the ATPase head domain of Smc5 might allosterically regulate the DNA-binding activity of its hinge domain. In this context, one would expect that the DNA-binding behavior of the Smc5hd fragment would show only part of the full DNA-binding response of the native molecule in the presence of ATP. Separate from this, it is also possible that the different types of DNA-binding assays used to monitor the effect of ATP on Smc5hd and native Smc5 [22] could explain part of the distinct responses of these proteins to the presence of nucleotides. Additional studies will be required to determine whether the ATPase head domain of Smc5 can effectively regulate at distance the DNA-binding activity of its hinge domain, and what would be the potential impact of this mode of regulation on Smc5-6 complex function.

Our biochemical characterization of Smc5-Smc6 heterodimers has several important implications for DSB repair reactions. During DSB repair by homologous recombination,

one key step is the search for homologous DNA sequences in the genome using Rad51-ssDNA filaments [54]. However, the RPA complex must bind ssDNA before this can take place. The dissociation constant of RPA for ssDNA is between 10^{-9} to 10^{-11} M, whereas that of Rad51 for the same substrate is 3×10^{-7} M [55, 56]. Thus, based solely on substrate affinity, the Rad51 protein might not be able to displace RPA from ssDNA, which is why Rad51 requires mediators to assemble into a filament in the presence of RPA-bound ssDNA [57].

In comparison, the Smc5-6 heterodimer dissociation constant for ssDNA is approximately 4×10^{-8} M, which is lower than that of RPA for the same substrate, but is also significantly higher than that of Rad51. Thus, the role played by the Smc5-6 complex in antagonizing homologous recombination at the rDNA/nucleolus [14] may be explained by a competitive advantage over Rad51 for its association with ssDNA substrates at this locus. Moreover, the nucleolar exclusion of a known mediator of Rad51 activity, the Rad52 protein [14], suggests that binding and filament formation on single-stranded rDNA substrates might rely more on Rad51 intrinsic affinity for this substrate, a scenario that would favour Smc5-6 complex association to ssDNA *in vivo* [58]. It is still unclear whether there is also a competitive relationship for ssDNA binding between RPA and the Smc5-6 complex during DSB repair reactions. It is conceivable that the Smc5-6 complex might require mediators, as in the case of Rad51, to displace RPA and bind to ssDNA substrates in the genome. A possible candidate for this function is the Nse5-6 complex, which interacts with the hinge domains of Smc5 and Smc6 [59], and might facilitate entry of the DNA substrate between the arms of Smc5 and Smc6 in a manner analogous to DNA entry into the cohesin ring.

complex [50]. At this point, we favor a non-competitive relationship between RPA and Smc5-6 complex binding to DNA based on the fact that, at saturation, RPA binds ssDNA every 90 to 100 nts [60]. Since RPA covers only 30 nts of ssDNA upon binding [55], this leaves approximately 60 to 70 nts of the substrate exposed between two RPA complexes. Our experiments revealed that tracks of 45-60 nts ssDNA are sufficient for stable binding of the Smc5-6 complex. Thus, it is conceivable, if not likely, that both RPA and Smc5-6 complexes would bind simultaneously to the same ssDNA fragments during DNA repair reactions. In this regard, it would be interesting to conduct *in vivo* experiments using the *rfa1-t11* mutant [61]—an allele of RPA with altered ssDNA-binding properties – to determine if this condition alters Smc5-6 complex localization to ssDNA lesions.

Loss of Smc5-6 complex activity leads to the appearance of unresolved links between homologous chromosomes, incomplete chromosome replication, and aberrant mitotic chromosome formation [15, 62]. If these abnormal chromosome structures persist until anaphase, they are likely to generate gross chromosome instability, a hallmark of cancer [63]. In this regard, it is interesting to note that the Smc5-6 complex is unloaded from chromosomes in late mitosis [35-38] and that this process is associated with the dissociation of the Smc5 subunit from the Smc5-6 complex [34]. Our results indicate that dissociation of Smc5 from the other components of the complex will likely affect their affinity for dsDNA substrates. Indeed, we have shown that Smc5-6 heterodimers bind more strongly to dsDNA than either SMC components in their monomeric form. The unloading of the Smc5-6 complex from mitotic chromosomes may be driven by a loss of intrinsic affinity

for duplex DNA in the mitotic form of the Smc5-6 complex. One reason why this dissociation process would be important for cells is because the multiple DNA-binding domains of Smc5-6 components might create intermolecular/non-sister chromatid linkages [21] that could impede chromosome segregation in anaphase. Dissociation of Smc5 from Smc6, and the accompanying reduction in the intrinsic affinity of the resulting complexes for chromosomal dsDNA, would thus provide an elegant mechanism to ensure effective chromosome partition during mitosis. This hypothesis is consistent with the formation of persistent DNA bridges in anaphase cells with misregulated Smc5-6 complex components [35, 64]. Testing this idea will require the identification of the trigger that is responsible for the mitosis-specific dissociation of Smc5 from the rest of the complex, an objective that will be the focus of future work.

4.6) Acknowledgements

We thank James Omichinski, Julie St-Pierre, and members of the D'Amours laboratory for their comments on the manuscript. Research in D.D.'s laboratory is supported by the Canadian Institutes of Health Research (MOP 82912). D.D. is a recipient of a Tier II Canada Research Chair in Cell Cycle Regulation and Genomic Integrity. M.-A.R. is supported by a graduate scholarship from the FRQS.

The abbreviations used are: ALT, alternative lengthening of telomeres; CV, column volume; DBD, DNA-binding domain; DSB, DNA double-strand break; EMSA, electrophoretic mobility shift assay; FL, full-length; hd, head domain; HL, hinge long; HM, hinge medium; HS, hinge short; rDNA, ribosomal DNA array; SMC, structural maintenance of chromosome; dsDNA, double-stranded DNA; ssDNA, single-stranded DNA; STH; 3xStreptagII-9xHIS fusion tag.

4.7) References

1. Papamichos-Chronakis, M. and C.L. Peterson, *Chromatin and the genome integrity network*. Nature reviews. Genetics, 2013. **14**(1): p. 62-75.
2. Ciccia, A. and S.J. Elledge, *The DNA damage response: making it safe to play with knives*. Molecular cell, 2010. **40**(2): p. 179-204.
3. Branzei, D. and M. Foiani, *Maintaining genome stability at the replication fork*. Nature reviews. Molecular cell biology, 2010. **11**(3): p. 208-19.
4. Gordon, D.J., B. Resio, and D. Pellman, *Causes and consequences of aneuploidy in cancer*. Nature reviews. Genetics, 2012. **13**(3): p. 189-203.
5. Hirano, T., *At the heart of the chromosome: SMC proteins in action*. Nature reviews. Molecular cell biology, 2006. **7**(5): p. 311-22.
6. De Piccoli, G., J. Torres-Rosell, and L. Aragon, *The unnamed complex: what do we know about Smc5-Smc6?* Chromosome research, 2009. **17**(2): p. 251-63.
7. Hudson, D.F., K.M. Marshall, and W.C. Earnshaw, *Condensin: Architect of mitotic chromosomes*. Chromosome research, 2009. **17**(2): p. 131-44.
8. Nasmyth, K. and C.H. Haering, *Cohesin: its roles and mechanisms*. Annual review of genetics, 2009. **43**: p. 525-58.
9. Heale, J.T., et al., *Condensin I interacts with the PARP-1-XRCC1 complex and functions in DNA single-strand break repair*. Molecular cell, 2006. **21**(6): p. 837-48.
10. Strom, L., et al., *Postreplicative recruitment of cohesin to double-strand breaks is required for DNA repair*. Molecular cell, 2004. **16**(6): p. 1003-15.
11. Strom, L. and C. Sjogren, *Chromosome segregation and double-strand break repair - a complex connection*. Current Opinion in cell biology, 2007. **19**(3): p. 344-9.
12. De Piccoli, G., et al., *Smc5-Smc6 mediate DNA double-strand-break repair by promoting sister-chromatid recombination*. Nature cell biology, 2006. **8**(9): p. 1032-4.
13. Potts, P.R., M.H. Porteus, and H. Yu, *Human SMC5/6 complex promotes sister chromatid homologous recombination by recruiting the SMC1/3 cohesin complex to double-strand breaks*. EMBO journal, 2006. **25**(14): p. 3377-88.
14. Torres-Rosell, J., et al., *The Smc5-Smc6 complex and SUMO modification of Rad52 regulates recombinational repair at the ribosomal gene locus*. Nature cell biology, 2007. **9**(8): p. 923-31.
15. Torres-Rosell, J., et al., *Anaphase onset before complete DNA replication with intact checkpoint responses*. Science, 2007. **315**(5817): p. 1411-5.
16. Potts, P.R. and H. Yu, *The SMC5/6 complex maintains telomere length in ALT cancer cells through SUMOylation of telomere-binding proteins*. Nature structural & molecular biology, 2007. **14**(7): p. 581-90.
17. Ivanov, D. and K. Nasmyth, *A Topological Interaction between Cohesin Rings and a Circular Minichromosome*. Cell, 2005. **122**(6): p. 849.
18. Cuylen, S., J. Metz, and C.H. Haering, *Condensin structures chromosomal DNA through topological links*. Nature structural & molecular biology, 2011. **18**(8): p. 894-901.
19. Schleiffer, A., et al., *Kleisins: a superfamily of bacterial and eukaryotic SMC protein partners*. Molecular cell, 2003. **11**(3): p. 571-5.

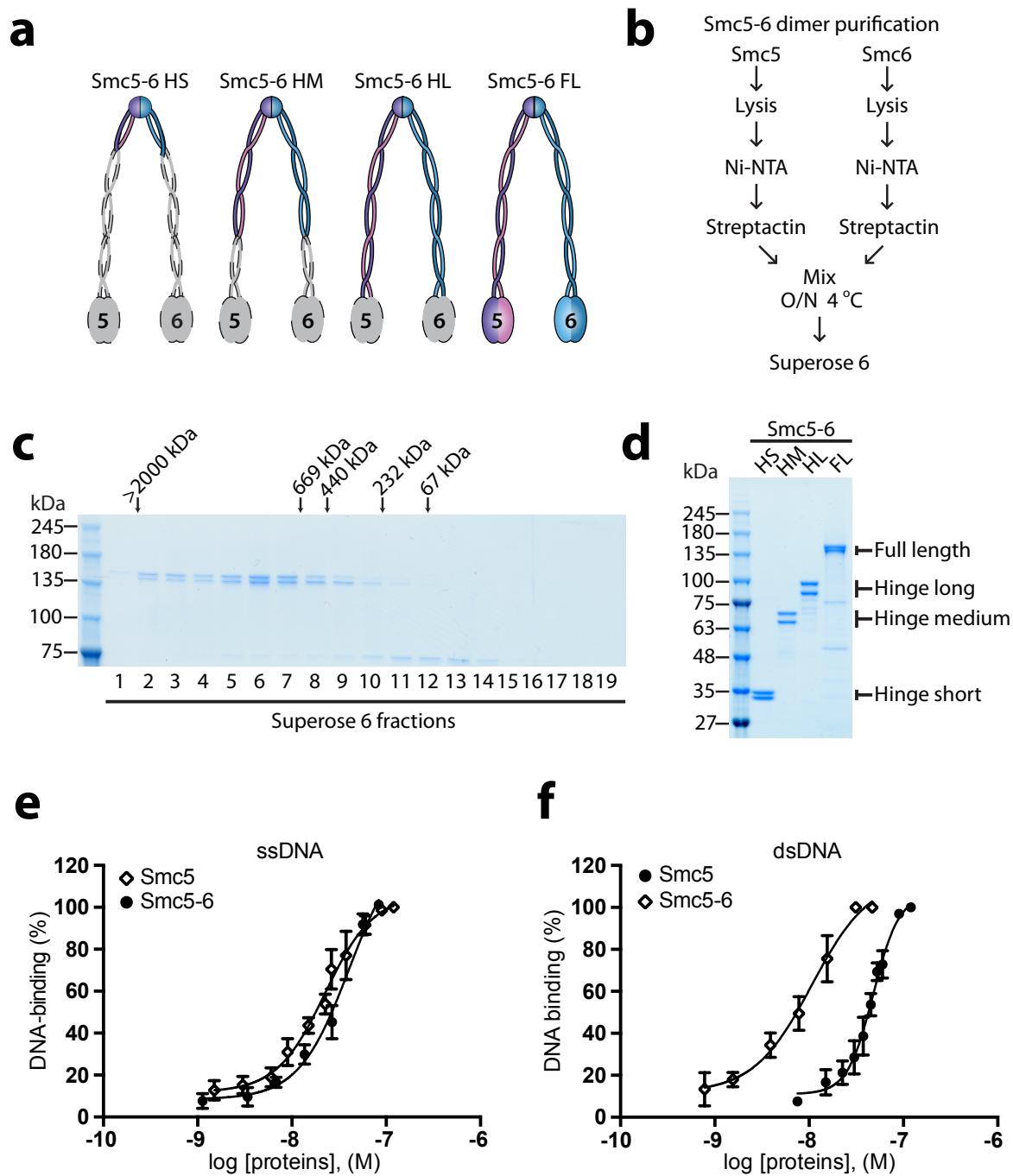
20. Haering, C.H., et al., *Molecular architecture of SMC proteins and the yeast cohesin complex*. Molecular cell, 2002. **9**(4): p. 773-88.
21. Reyes, E.D., et al., *RecN is a cohesin-like protein that stimulates intermolecular DNA interactions in vitro*. Journal of biological chemistry, 2010. **285**(22): p. 16521-9.
22. Roy, M.A., N. Siddiqui, and D. D'Amours, *Dynamic and selective DNA-binding activity of Smc5, a core component of the Smc5-Smc6 complex*. Cell cycle, 2011. **10**(4): p. 690-700.
23. Roy, M.A. and D. D'Amours, *DNA-binding properties of Smc6, a core component of the Smc5-6 DNA repair complex*. Biochemistry & Biophysical research communication, 2011. **416**(1-2): p. 80-85.
24. Graslund, S., et al., *Protein production and purification*. Nature Methods, 2008. **5**(2): p. 135-46.
25. Arumugam, P., et al., *Cohesin's ATPase activity is stimulated by the C-terminal Winged-Helix domain of its kleisin subunit*. Current biology, 2006. **16**(20): p. 1998-2008.
26. Constantinou, A., A.A. Davies, and S.C. West, *Branch migration and Holliday junction resolution catalyzed by activities from mammalian cells*. Cell, 2001. **104**(2): p. 259-268.
27. Trujillo, K.M., et al., *Yeast xrs2 binds DNA and helps target rad50 and mre11 to DNA ends*. Journal of biological chemistry, 2003. **278**(49): p. 48957-64.
28. Laflamme, G., et al., *Structural maintenance of chromosome (SMC) proteins link microtubule stability to genome integrity*. Journal of biological chemistry, 2014. **289**(40): p. 27418-31.
29. St-Pierre, J., et al., *Polo kinase regulates mitotic chromosome condensation by hyperactivation of condensin DNA supercoiling activity*. Molecular cell, 2009. **34**(4): p. 416-26.
30. Hirano, T. and T.J. Mitchison, *A heterodimeric coiled-coil protein required for mitotic chromosome condensation in vitro*. Cell, 1994. **79**(3): p. 449-58.
31. Anderson, D.E., et al., *Condensin and cohesin display different arm conformations with characteristic hinge angles*. Journal of cell Biology, 2002. **156**(3): p. 419-24.
32. Kimura, K. and T. Hirano, *Dual roles of the 11S regulatory subcomplex in condensin functions*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2000. **97**(22): p. 11972-7.
33. Sakai, A., et al., *Condensin but not cohesin SMC heterodimer induces DNA reannealing through protein-protein assembly*. EMBO Journal, 2003. **22**(11): p. 2764-75.
34. Behlke-Steinert, S., et al., *SMC5 and MMS21 are required for chromosome cohesion and mitotic progression*. Cell cycle, 2009. **8**(14): p. 2211-8.
35. Gallego-Paez, L.M., et al., *Smc5/6-mediated regulation of replication progression contributes to chromosome assembly during mitosis in human cells*. Molecular biology of the cell, 2014. **25**(2): p. 302-17.
36. Taylor, E.M., et al., *Characterization of a novel human SMC heterodimer homologous to the Schizosaccharomyces pombe Rad18/Spr18 complex*. Molecular biology of the cell, 2001. **12**(6): p. 1583-94.

37. Tsuyama, T., et al., *Chromatin loading of Smc5/6 is induced by DNA replication but not by DNA double-strand breaks*. Biochemical & Biophysical research communication, 2006. **351**(4): p. 935-939.
38. Jeppsson, K., et al., *The chromosomal association of the Smc5/6 complex depends on cohesion and predicts the level of sister chromatid entanglement*. PLoS Genetic, 2014. **10**(10): p. e1004680.
39. Vasquez, K.M., et al., *Human XPA and RPA DNA repair proteins participate in specific recognition of triplex-induced helical distortions*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2002. **99**(9): p. 5848-53.
40. Liu, J., et al., *Rad51 paralogues Rad55-Rad57 balance the antirecombinase Srs2 in Rad51 filament formation*. Nature, 2011. **479**(7372): p. 245-8.
41. Hellman, L.M. and M.G. Fried, *Electrophoretic mobility shift assay (EMSA) for detecting protein-nucleic acid interactions*. Nature Protocols, 2007. **2**(8): p. 1849-1861.
42. Hopfner, K.P., et al., *Structural biochemistry and interaction architecture of the DNA double-strand break repair Mre11 nuclease and Rad50-ATPase*. Cell, 2001. **105**(4): p. 473-85.
43. Lowe, J., S.C. Cordell, and F. van den Ent, *Crystal structure of the SMC head domain: an ABC ATPase with 900 residues antiparallel coiled-coil inserted*. Journal of molecular biology, 2001. **306**(1): p. 25-35.
44. Woo, J.S., et al., *Structural studies of a bacterial condensin complex reveal ATP-dependent disruption of intersubunit interactions*. Cell, 2009. **136**(1): p. 85-96.
45. Hirano, M. and T. Hirano, *Hinge-mediated dimerization of SMC protein is essential for its dynamic interaction with DNA*. Embo journal, 2002. **21**(21): p. 5733-44.
46. Akhmedov, A.T., et al., *Structural maintenance of chromosomes protein C-terminal domains bind preferentially to DNA with secondary structure*. Journal of biological chemistry, 1998. **273**(37): p. 24088-94.
47. Akhmedov, A.T., B. Gross, and R. Jessberger, *Mammalian SMC3 C-terminal and coiled-coil protein domains specifically bind palindromic DNA, do not block DNA ends, and prevent DNA bending*. Journal of biological chemistry, 1999. **274**(53): p. 38216-24.
48. Chiu, A., E. Revenkova, and R. Jessberger, *DNA interaction and dimerization of eukaryotic SMC hinge domains*. Journal of biological chemistry, 2004. **279**(25): p. 26233-42.
49. Griese, J.J., G. Witte, and K.P. Hopfner, *Structure and DNA binding activity of the mouse condensin hinge domain highlight common and diverse features of SMC proteins*. Nucleic acids research, 2010. **38**(10): p. 3454-65.
50. Kurze, A., et al., *A positively charged channel within the Smc1/Smc3 hinge required for sister chromatid cohesion*. EMBO journal, 2011. **30**(2): p. 364-78.
51. Akai, Y., et al., *Opposing role of condensin hinge against replication protein A in mitosis and interphase through promoting DNA annealing*. Open biology, 2011. **1**(4): p. 110023.
52. Hirano, M. and T. Hirano, *ATP-dependent aggregation of single-stranded DNA by a bacterial SMC homodimer*. Embo journal, 1998. **17**(23): p. 7139-48.

53. Moreno-Herrero, F., et al., *Mesoscale conformational changes in the DNA-repair complex Rad50/Mre11/Nbs1 upon binding DNA*. Nature, 2005. **437**(7057): p. 440-443.
54. Krejci, L., et al., *Homologous recombination and its regulation*. Nucleic acids research, 2012. **40**(13): p. 5795-818.
55. Broderick, S., et al., *Eukaryotic single-stranded DNA binding proteins: central factors in genome stability*. Sub-cellular biochemistry, 2010. **50**: p. 143-63.
56. Cloud, V., et al., *Rad51 is an accessory factor for Dmc1-mediated joint molecule formation during meiosis*. Science, 2012. **337**(6099): p. 1222-5.
57. New, J.H., et al., *Rad52 protein stimulates DNA strand exchange by Rad51 and replication protein A*. Nature, 1998. **391**(6665): p. 407-10.
58. Chiolo, I., et al., *Double-strand breaks in heterochromatin move outside of a dynamic HP1a domain to complete recombinational repair*. Cell, 2011. **144**(5): p. 732-44.
59. Duan, X., et al., *Architecture of the Smc5/6 Complex of Saccharomyces cerevisiae Reveals a Unique Interaction between the Nse5-6 Subcomplex and the Hinge Regions of Smc5 and Smc6*. Journal of biological chemistry, 2009. **284**(13): p. 8507-15.
60. Alani, E., et al., *Characterization of DNA-binding and strand-exchange stimulation properties of γ -RPA, a yeast single-strand-DNA-binding protein*. Journal of molecular biology, 1992. **227**(1): p. 54-71.
61. Kantake, N., et al., *The recombination-deficient mutant RPA (*rfa1-t11*) is displaced slowly from single-stranded DNA by Rad51 protein*. Journal of biological chemistry, 2003. **278**(26): p. 23410-7.
62. Bermudez-Lopez, M., et al., *The Smc5/6 complex is required for dissolution of DNA-mediated sister chromatid linkages*. Nucleic acids research, 2010. **38**(19): p. 6502-12.
63. Mankouri, H.W., D. Huttner, and I.D. Hickson, *How unfinished business from S-phase affects mitosis and beyond*. EMBO journal, 2013. **32**(20): p. 2661-71.
64. Gomez, R., et al., *Dynamic localization of SMC5/6 complex proteins during mammalian meiosis and mitosis suggests functions in distinct chromosome processes*. Journal of cell science, 2013. **126**(Pt 18): p. 4239-52.

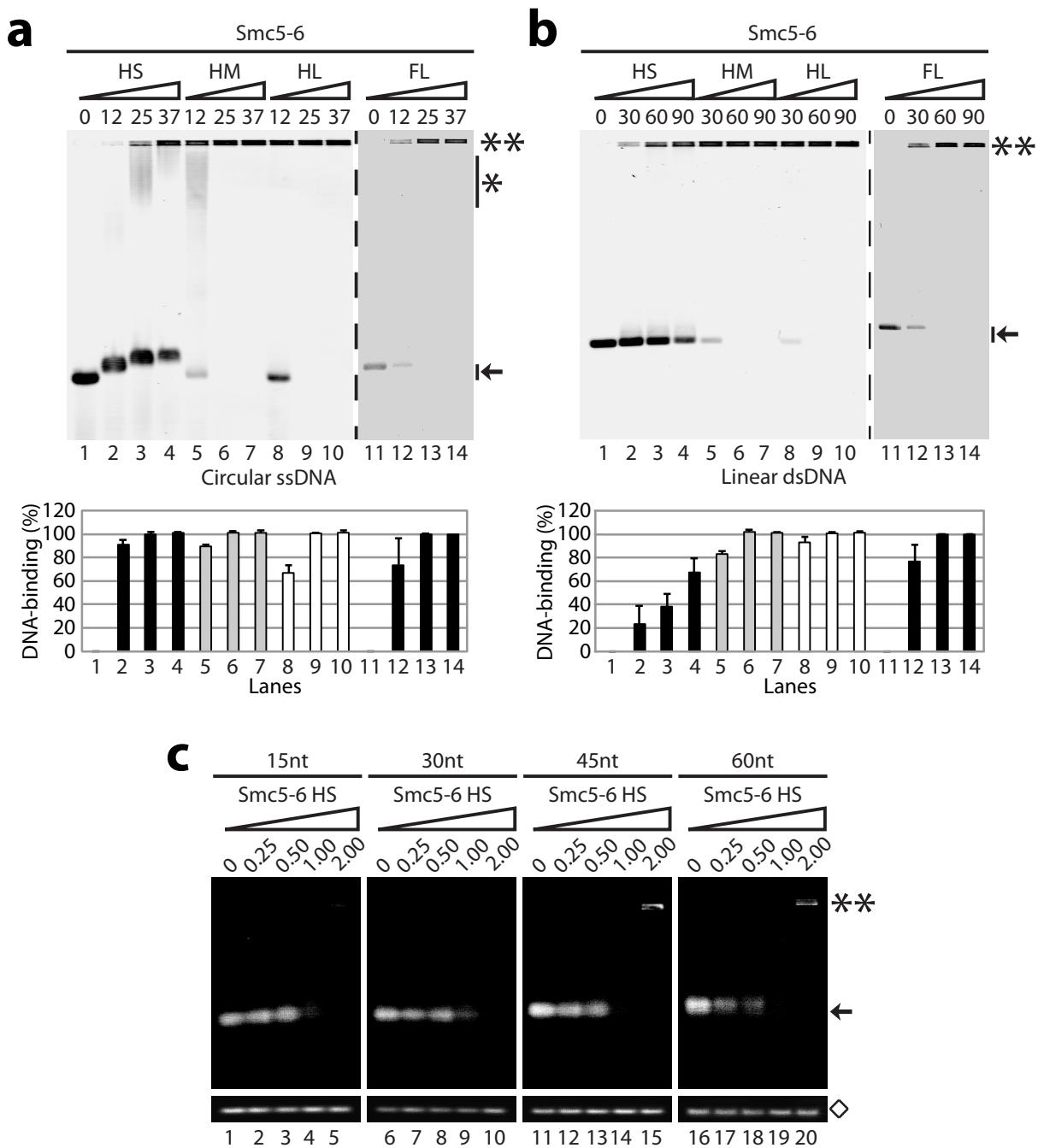
4.8) Figures

Figure 1. Purification and DNA-binding activity of Smc5-6 heterodimers



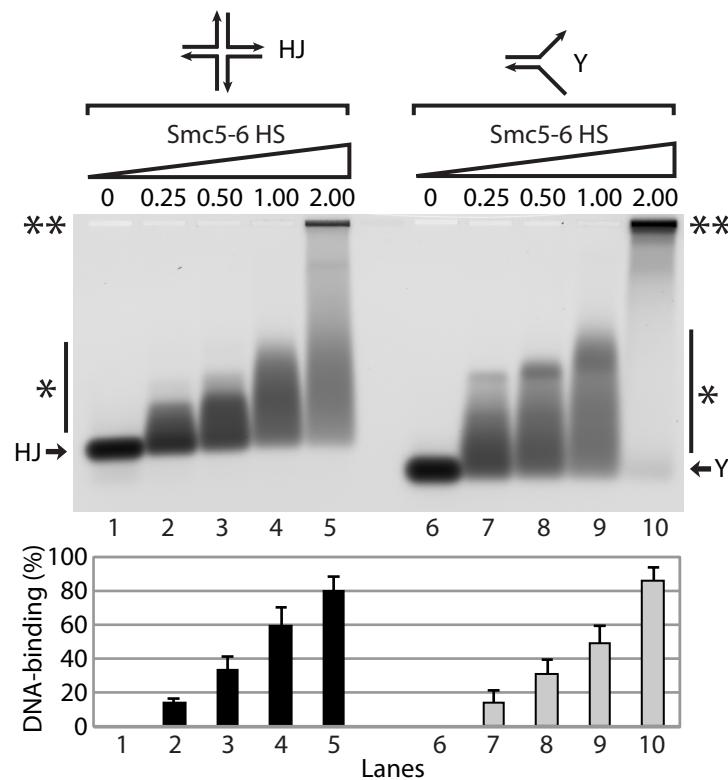
Purification and DNA-binding activity of Smc5-6 heterodimers. (a) Schematic representation of the Smc5-6 fragments and full-length proteins used in this study. The colored parts of the schematics indicate the sections of the proteins that are included in each Smc5-6 heterodimer variant. (b) Schematic representation of the Smc5-6 FL purification procedure. (c) Elution profile of the Smc5-6 FL heterodimer from the Superose 6 column. The peak positions where molecular weight standards eluted from the gel exclusion column are marked on the top of the gel. (d) The purity of the Smc5-6 heterodimers used in this study is shown after separation by SDS-PAGE and staining with Coomassie brilliant blue. (e) Association of the Smc5-6 FL heterodimer to ssDNA in a saturation binding experiment. DNA-binding was measured by EMSA with increasing concentration of Smc5-6 proteins, as previously performed [22]. The free DNA and DNA-bound forms were quantified and plotted on the graph as a percentage of the Smc5-6 heterodimer DNA-binding activity. Each dataset is the mean \pm standard error from three independent experiments. For comparison, we included previously published data for Smc5 monomer binding to ssDNA [22]. (f) Association of the Smc5-6 FL heterodimer to dsDNA in a saturation binding experiment. The reactions were performed as described above, except that a duplex DNA substrate was used.

Figure 2. Comparative analysis of the DNA-binding activity of Smc5-6 heterodimer variants



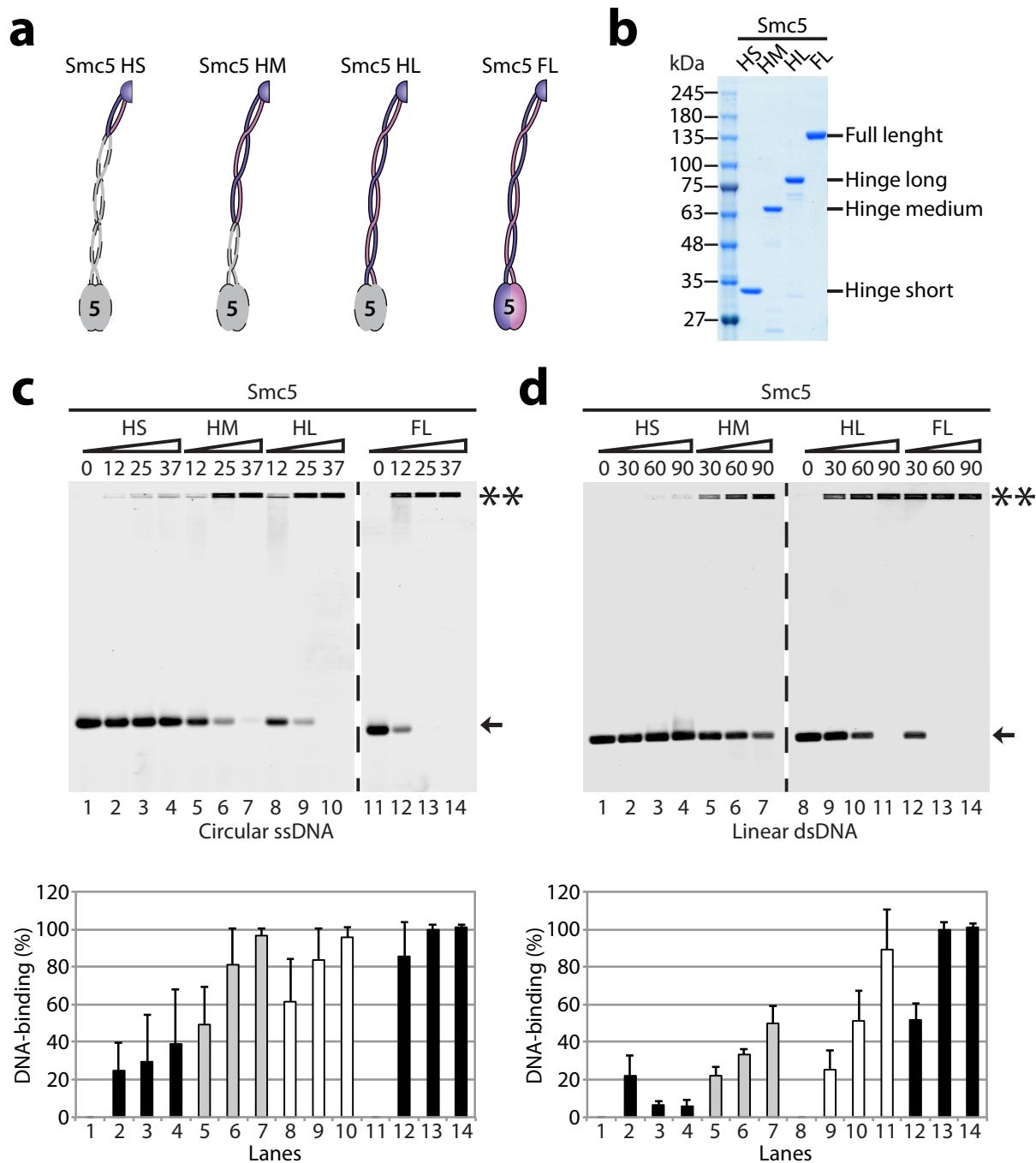
Comparative analysis of the DNA-binding activity of Smc5-6 heterodimer variants. (a) The DNA-binding properties of various Smc5-6 heterodimers were determined by EMSA saturation experiments. The purified proteins were incubated with ssDNA for 30 min at 30 °C and the resulting protein-DNA complexes were resolved by agarose gel electrophoresis, as previously described [22]. The numbers above the gels correspond to the molar ratio of protein over ssDNA in each lane. The double asterisks indicate the position of the protein-DNA complexes; the asterisk with a bar indicates the smear in the gel formed by Smc5-6 heterodimer–DNA complexes, whereas the arrow indicates the position of the free ssDNA. Quantification of DNA-binding is shown in the bar graph below the agarose gel. The unbound ssDNA was quantified in each lane and plotted as a percentage of the protein-DNA complex over free DNA. Each bar is the mean ± standard error of three independent experiments. (b) DNA-binding properties of Smc5-6 hinge fragments and full-length proteins for duplex DNA substrates. The reactions were performed as described above. (c) Length-dependent DNA-binding activity of the Smc5-6 HS heterodimer. The Smc5-6 HS complex was incubated with ss oligonucleotides of different lengths (15, 30, 45 and 60 nt) for 30 min at 30 °C. After incubation, the reactions were loaded on a 2% agarose gel, and the DNA bands were visualized with UV exposure [22]. The number above the gel is the molar excess of Smc5-6 HS protein over the ss oligonucleotides. The double asterisks indicate the position of the DNA-bound form, whereas the arrow indicates the position of the free DNA in the gel. The diamond indicates the total ss oligonucleotide in each reaction after digestion with a protease and DNA extraction.

Figure 3. Binding of Smc5-6 heterodimers to structured DNA molecules.



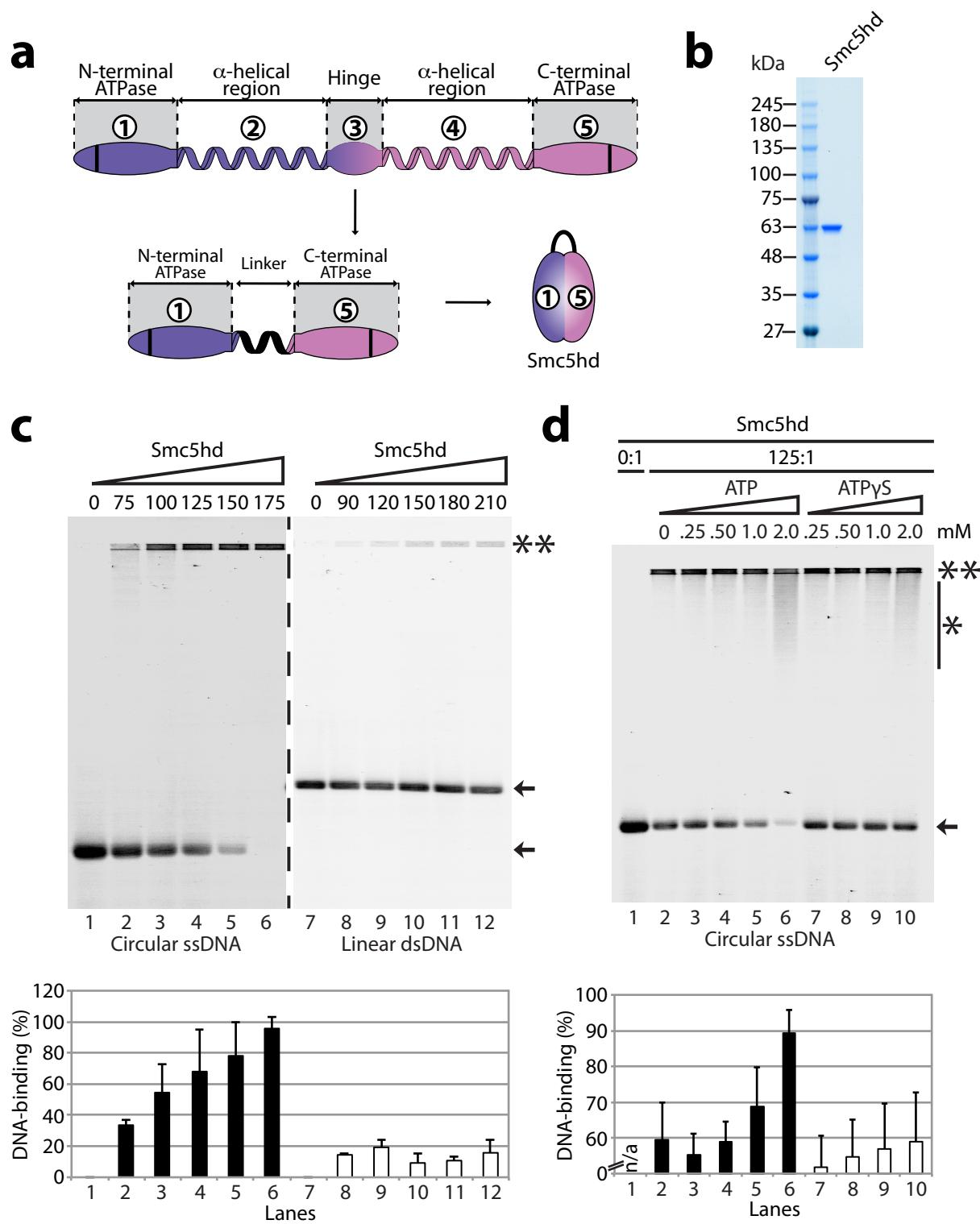
The DNA-binding ability of the Smc5-6 HS heterodimer was monitored in EMSA saturation experiments with HJ and splayed Y molecules, as described above. The numbers above the gels correspond to the molar ratio of protein over HJ and splayed Y DNA molecules in each condition. The double asterisks indicate the position of fully-retarded Smc5-6 HS-DNA complexes; the single asterisk next to a vertical bar indicates the positions of partly-retarded nucleoprotein species, and the arrows indicate the positions of free HJ and splayed Y substrates. Quantification of DNA-binding is shown in the bar graph below the gel. The unbound DNA was quantified in each lane and plotted as a percentage of the protein-DNA complex over free DNA. Each bar is the mean \pm standard error of three independent experiments.

Figure 4. DNA-binding properties of Smc5 monomeric variants.



(a) Schematic representation of the Smc5 monomeric variants used in this analysis. The colored portions indicate portion of Smc5 protein included in each construct. (b) Smc5 hinge fragments were purified from a bacterial extract through nickel-NTA affinity chromatography and size exclusion chromatography on Superose 6 or 12 resins. The purity of each construct is shown in the Coomassie-stained gel. (c) The purified Smc5 hinge fragments and full-length proteins were incubated with ssDNA for 30 min at 30 °C as before. The numbers above the gels are the molar ratios of protein over ssDNA. The double asterisks indicate the position of protein-DNA complexes, whereas the arrow indicates the position of free ssDNA. The bar graph at the bottom of the agarose gel represents the percentage of DNA binding. The unbound ssDNA was quantified as before, and bars in the graph represent the mean ± standard error from three independent experiments. (d) The association of hinge monomer variants and Smc5 full-length protein with dsDNA was tested, as described above.

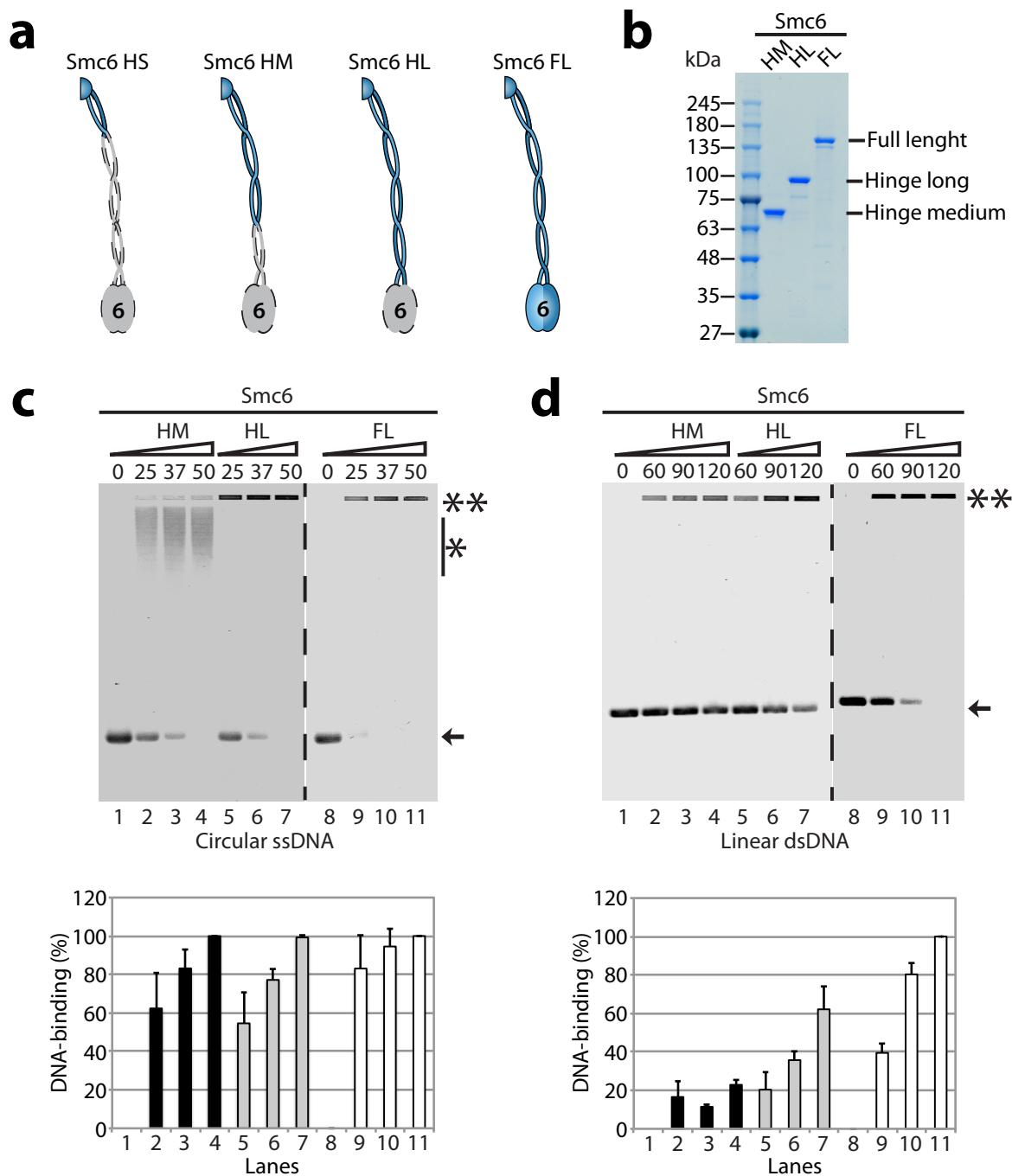
Figure 5. Smc5 ATPase head domain purification and DNA-binding activity.



(a) A schematic representation of the domain organization in the unfolded Smc5 protein. To obtain a functional Smc5 ATPase head domain (hd), a small flexible linker of 14 amino acids replaced the central hinge and two α -helical regions. This small linker allowed the two ATPase moieties to fold back on each other and form a complete ATPase head domain [25].

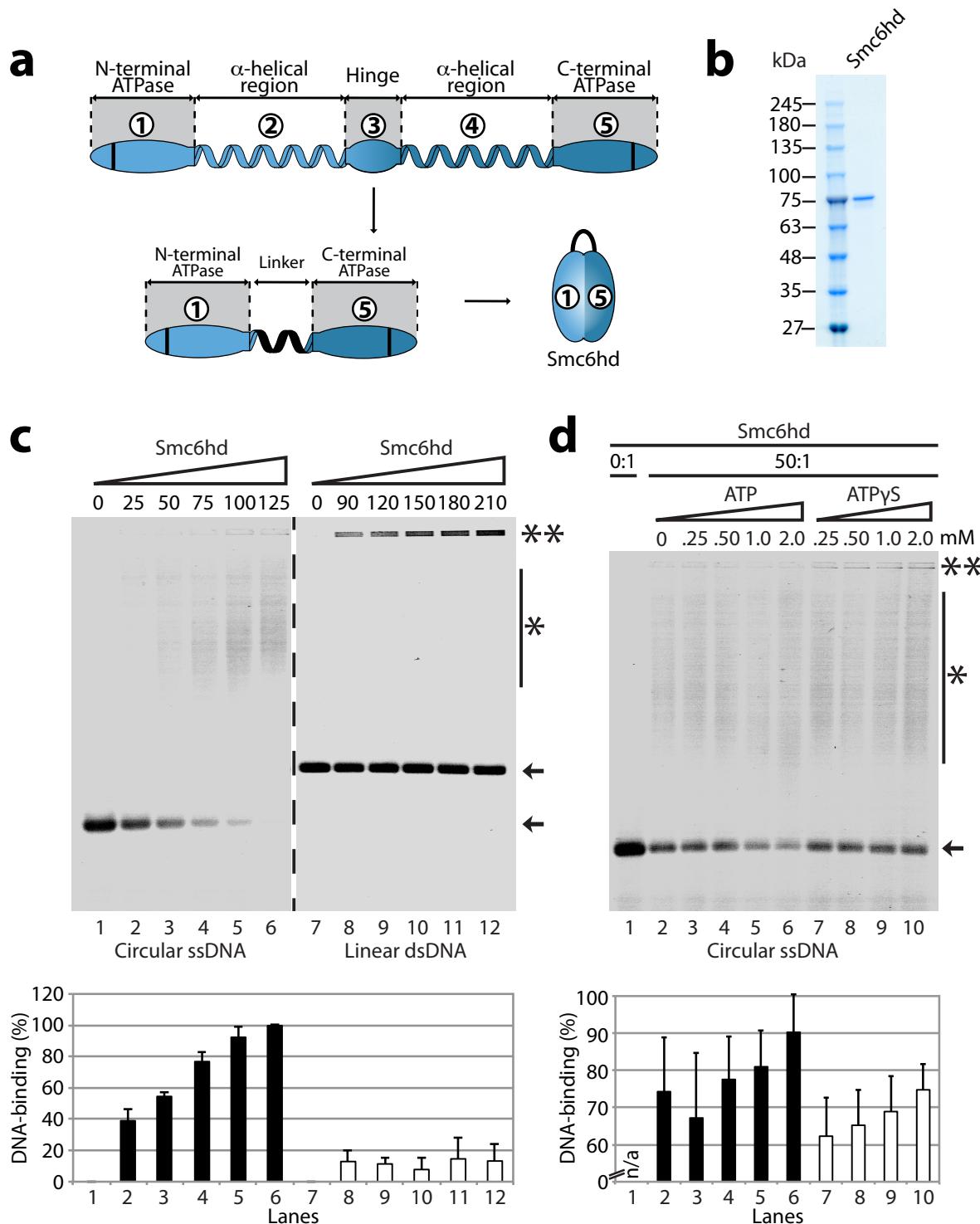
(b) The Smc5hd was purified from yeast extract using nickel-NTA and StrepTrap[®] affinity chromatography followed by separation via anion exchange on a Q column. The protein purity is shown in the Coomassie-stained gel. (c) The purified Smc5hd was incubated with various types of DNA for 30 min at 30 °C to test its DNA-binding properties, as before. The types of DNA tested were ssDNA (left) and dsDNA (right). The numbers above the gels are the molar ratios of protein over DNA in each lane. The double asterisks indicate the position of the protein-DNA complexes, whereas the arrow indicates the position of free DNA. The bar graph at the bottom of the agarose gels shows the percentage of DNA binding. The unbound ssDNA was quantified as before, and bars in the graph represent the mean \pm standard error from three independent experiments. (d) The effects of ATP or ATPyS on Smc5hd ssDNA binding properties. The purified protein was incubated with ssDNA and various concentrations of ATP or ATPyS for 30 min at 30 °C, and the reactions were processed as previously described. The numbers above the gel indicate the concentration of ATP or ATPyS in each lane. The asterisk with a bar indicates the smear in the gel formed by the Smc5 ATPase head–DNA complexes. The bar graph below the agarose gel represents the percentage of DNA binding. Each bar represents the mean \pm standard error from three independent experiments.

Figure 6. Smc6 fragment purification and DNA-binding activity.



(a) Schematic representation of Smc6 fragments and full-length protein used herein. The colored portion shows the parts of Smc6 included in each construct. (b) The Smc6 hinge fragments were purified from a bacterial extract using StrepTrap[®] affinity chromatography followed by size exclusion chromatography with Superose 6 or 12 resins. The purity of each construct is shown in the Coomassie-stained gel. (c) The purified Smc6 hinge variants and full-length protein were incubated with ssDNA for 30 min at 30 °C to determine their DNA-binding properties, as described above for the Smc5 variants. The bar graph at the bottom of the agarose gel represents the percentage of DNA binding. Each bar is the mean ± standard error from three independent experiments. (d) The DNA-binding activities of the Smc6 hinge fragments and full-length protein were tested using dsDNA, as before.

Figure 7. The DNA-binding activity of Smc6 head domain is modulated by ATP hydrolysis.



(a) Schematic representation of the unfolded (linear) and folded Smc6 ATPase domain organization. The Smc6hd was obtained using a similar strategy to that showed for Smc5 in Figure 5. (b) The Smc6hd was purified from yeast extract through nickel-NTA, StrepTrap®, and cation exchange chromatography on a SP-sepharose column. The protein purity is indicated in the Coomassie-stained gel. (c) The purified Smc6hd was incubated with various types of DNA for 30 min at 30 °C to test its DNA-binding activity, as described above for Smc5hd. The numbers above the gels are the molar ratio of protein over ssDNA. The double asterisks indicate the position of the most retarded protein-DNA complexes in the gels, the asterisk with a bar indicates the smear in the gel formed by the Smc6hd–DNA complexes, whereas the arrow indicates the position of the free ssDNA. The bar graph at the bottom of the agarose gel represents the percentage of DNA binding. Each bar is the mean ± standard error from three independent experiments. (d) The effects of ATP or ATPyS on Smc6hd ssDNA binding properties. The purified protein was incubated with ssDNA and various ATP or ATPyS concentrations for 30 min at 30 °C and the reactions were processed as above. To optimize our ability to detect putative effects of ATP in the EMSA assay, we used throughout this series of experiments a Smc6hd:DNA molar ratio that yields a partial DNA shift in absence of ATP (*i.e.*, ~60-70% binding under basal conditions). The numbers above the gel indicate the concentration of ATP or ATPyS in each lane. Note that the asterisk with a bar indicates the smear in the gel formed by the Smc6 ATPase–DNA complexes. The bar graph at the bottom of the agarose gel represents the percentage of DNA binding. Each bar is the mean ± standard error from three independent experiments.

4.9) Table

Table 1: Plasmids used in this study

Protein	Amino acid position	Vector backbone
Smc5 HS	428-675	pETDuet-1/pET-28a
Smc5 HM	300-803	pETDuet-1/pET-28a
Smc5 HL	215-885	pET-28a
Smc5 hd	1-230 and 910-1093	YEpFAT4
Smc5 FL	1-1093	YEpFAT4
Smc6 HS	486-732	pETDuet-1/pET-41a
Smc6 HM	350-868	pETDuet-1/pET-41a
Smc6 HL	260-970	pET-30a
Smc6 hd	1-280 and 820-1114	YEpFAT4
Smc6 FL	1-1114	YEpFAT4

5.0) Discussion

Cette thèse, incluant ses études, jette une lumière nouvelle sur la biochimie encore méconnue du complexe Smc5-6. À cet égard, elle apporte plusieurs réponses importantes concernant les deux sous-unités SMC, l'unité de base de ce complexe. Ces nouvelles données permettent une identification plus précise du substrat ADN favori des protéines Smc5 et Smc6, de même que leurs principaux domaines impliqués dans la liaison à l'ADN.

5.1) Comparaison entre cohésine, condensine et Smc5-6

Cohésine, condensine et Smc5-6 sont trois complexes protéiques impliqués dans la réparation de l'ADN qui démontrent une grande ressemblance structurelle. Les expériences biochimiques démontrent que cohésine et condensine peuvent lier directement l'ADN nue. Cependant, il existe une grande différence entre ces deux complexes en ce qui concerne leur substrat de préférence. Par exemple, le dimère Smc2-4 FL («full length») et l'hétéropentamère favorisent l'ADNsb, alors que cohésine préfère l'ADNdb [32, 413]. Afin d'établir la préférence de substrat du complexe Smc5-6 et de déterminer sa capacité à lier directement l'ADN nue, une étude biochimique s'avère essentielle.

Les publications présentées dans cette thèse présentent, en premier lieu, les protocoles élaborés pour la purification de Smc5 et Smc6 après surexpression chez la levure *S. cerevisiae*. L'utilisation d'essais EMSA «Electrophoretic Mobility Shift Assay» après la purification démontre la préférence des protéines d'intérêts pour l'ADNsb. De plus, ces protéines présentent une interaction plus stable avec l'ADNsb qu'avec l'ADNdb. En ce sens, les monomères Smc5 et Smc6 ressemblent au complexe condensine. Néanmoins,

contrairement aux monomères, le dimère Smc5-6 FL favorise l'ADNdb. Ainsi, il apparaît que la dimérisation de ces protéines affecte significativement leur préférence de substrat.

La prochaine étape de la caractérisation fut la détermination de la longueur minimale d'ADN requise pour qu'une liaison stable s'installe avec les protéines Smc5 ou Smc6. À cette fin, les longs fragments d'ADN furent remplacés par de petits oligonucléotides de différentes longueurs. Cette substitution permise de révéler la longueur minimale d'ADNsb requise pour la liaison de Smc5, soit 45 nts, et 60 nts pour la liaison de Smc6. Au niveau de l'ADNdb, cette longueur représente plus de 60 bp pour Smc5 et 75 bp pour Smc6. Une première hypothèse permettant d'expliquer cette différence de longueur repose sur l'existence de plusieurs sites distincts et indépendants de liaison à l'ADN. Par conséquent, un premier site se situerait sur la protéine Smc5 et un second site sur la protéine Smc6. Ce postulat est basé sur le complexe RPA qui nécessite, pour une liaison stable, une longueur d'ADNsb différente selon le nombre de OB-fold présents sur le complexe [414-416]. Afin de vérifier cette hypothèse, le même essai fut réalisé avec le dimère Smc5-6 HS («hinge short»). L'utilisation de ce dimère démontra que la longueur minimale pour une liaison stable à l'ADNsb est de 45 nts. Par conséquent, il semble que la différence entre Smc5 et Smc6 ne soit pas secondaire à la présence de plusieurs sites de liaison.

Le fait que le site de liaison à l'ADNsb sur le complexe Smc5-6 soit divisé en deux constitue une autre hypothèse. Une partie se situerait donc sur la protéine Smc5 et l'autre

partie sur la protéine Smc6. Ce raisonnement concorde mieux avec la structure connue à ce jour et les expériences réalisées avec le domaine «hinge» de cohésine et condensine [27, 36]. À titre comparatif, le dimère Smc2-4 FL et l'hétéro pentamère peuvent lier de façon stable un fragment de 35 bp, alors que dans le cas de l'ADNsb, le dimère Smc2-4 HS peut lier un fragment de 30 nts [27, 103]. Dans le cas du complexe cohésine, le dimère Smc1-3 HS peut lier un fragment aussi petit que 25 bp [32]. Ces résultats démontrent que cohésine et condensine peuvent lier des morceaux d'ADN deux fois plus petit que ceux du complexe Smc5-6. Cependant, d'un point de vue physiologique, l'impact de ces longueurs mérite d'être exploré.

Au niveau de l'ADNdb, le segment d'ADN libre de tout octamère d'histones est situé entre 20 et 30 bp chez la levure *S. cerevisiae* [417]. Cette distance, insuffisante pour la liaison d'un seul complexe Smc5-6, permet cependant la liaison du complexe cohésine. Pour l'ADNsb, les intermédiaires de recombinaison rencontrés durant la réparation et la réPLICATION de l'ADN autorisent la liaison de plusieurs complexes Smc5-6 ou condensine [418, 419]. Par contre, l'ADNsb est rarement nue dans la cellule. L'impact de ce paramètre sera discuté plus loin.

L'objectif suivant l'obtention de ces résultats fut de déterminer l'emplacement du site de liaison à l'ADN sur Smc5 et Smc6. Pour parvenir à cette fin, une dissection moléculaire de chaque protéine SMC permit leur séparation en trois domaines fonctionnels : le «hinge», le «coiled-coil» et la tête ATPase. Cette dissection révéla la

présence de deux sites de liaison sur chaque protéine SMC; le premier étant situé dans le domaine «hinge» ainsi que la région adjacente du domaine «coiled-coil» et le deuxième se trouvant au niveau de la tête ATPase. En parallèle, le site de liaison à l'ADN sur cohésine et condensine se trouve au même endroit que le premier site découvert sur les protéines Smc5 et Smc6 [27, 32, 103]. Parmi les deux sites de liaison sur Smc5 et Smc6, le second site présente une affinité moindre pour le substrat et pourrait donc être considéré comme un site de liaison secondaire.

Étant membre de la famille SMC, Smc5 et Smc6 possèdent des motifs de liaison et d'hydrolyse de l'ATP. La prochaine étape fut donc de déterminer si l'activité ATPase de ces protéines permet la régulation de leur liaison à l'ADN. À cette fin, des expériences de liaison à l'ADN furent réalisées en présence ou absence d'ATP. Pour Smc6 FL, l'addition d'ATP dans la réaction provoque une modeste augmentation de la liaison à l'ADNs. Le même résultat est aussi valide pour la tête ATPase de Smc6 et Smc5. Cependant, l'augmentation de la liaison à l'ADN n'est pas observée chez les autres complexes SMC et aucun changement ne fut remarqué lors de l'addition d'ATP dans la réaction de liaison à l'ADN de la protéine Smc5 FL. L'utilisation d'un autre essai, «le pelleting assay» fut nécessaire. Ce dernier démontre qu'en présence d'ADNs, la protéine Smc5 FL forme de larges complexes nucléoprotéiques formant un culot lorsque centrifugés à basse vitesse. Cette propriété des protéines SMC fut aussi établie pour le complexe BsSMC. Contrairement à BsSMC, l'addition d'ATP à cette réaction provoque le relâchement de la protéine Smc5 FL des complexes nucléoprotéiques.

5.2) Interaction entre l'ADNdb et le complexe Smc5-6

Bien que les protéines Smc5 et Smc6 possèdent une affinité moindre pour l'ADNdb, elles peuvent tout de même s'y lier. Cette liaison ne peut cependant se produire qu'à une faible force ionique. Ainsi, à une concentration de sel dite physiologique, l'interaction entre Smc5 ou Smc6 et l'ADNdb est perdue. Cette perte d'interaction de la part du monomère soulève un questionnement au sujet du complexe entier. En effet, cette perte d'interaction peut signifier que le complexe entier lie l'ADNdb de façon topologique. Pour confirmer cette hypothèse, diverses expériences doivent être menées. Il est possible de les diviser en deux parties : les expériences *in vitro* et les expériences *in vivo*.

Tout d'abord, les expériences *in vitro* reposent sur l'utilisation du dimère Smc5-6 FL. Ce dimère est très utile principalement parce que le bas de son arche n'est pas fermé, c'est-à-dire que l'arche demeure en position ouverte, en raison de l'absence de protéine de type «kleisin». Il est donc possible de démontrer que le dimère Smc5-6 FL lie l'ADNdb circulaire. La même expérience peut ensuite être reproduite, mais à une concentration de sel physiologique, ce qui devrait abolir la liaison du dimère.

Pour la suite des expériences, l'arche doit être fermée de façon artificielle. À cette fin, l'utilisation de l'ATP γ S, une molécule d'ATP non hydrolysable, est essentielle, car elle permet de fermer l'arche après sa liaison au dimère (figure 5.1A). Puisqu'elle a besoin d'un complexe de chargement pour lier l'ADN, l'arche fermée (anneau fermé) ne devrait pas être en mesure de s'y lier (figure 5.1B). Par contre, l'utilisation de la même technique après la

liaison à l'ADN provoque la création d'un anneau autour de l'ADN (figure 5.1C). En raison de cette contrainte physique, l'anneau ne peut sortir de l'ADN et la liaison est maintenue. Ces expériences constituent une preuve indirecte de la liaison à l'ADN de façon topologique.

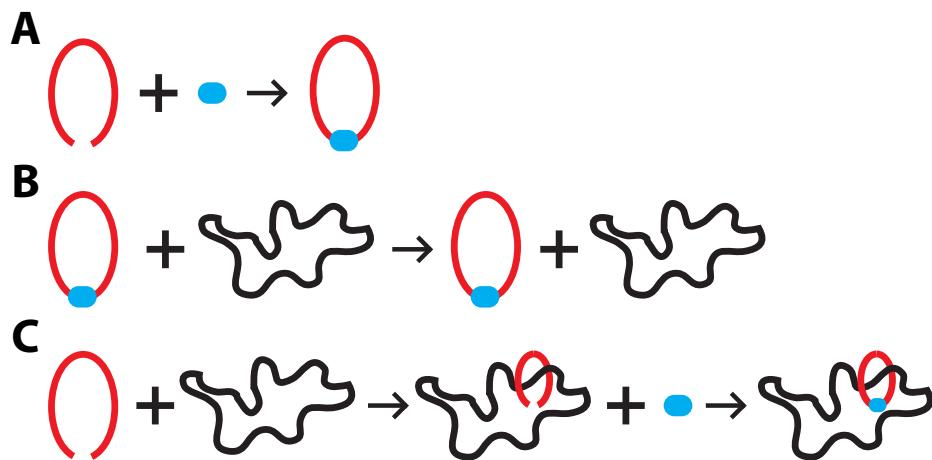


Figure 5.1

Expérience de liaison en présence d'ATPyS. A) L'incubation du dimère Smc5-6 (arche rouge) avec de l'ATPyS (cercle bleu) permet la fermeture de l'arche. B) Incubation de l'arche fermée en présence d'ADNdb circulaire (ligne noire). Il ne peut pas y avoir liaison puisque deux cercles fermés ne peuvent entrer l'un dans l'autre. C) Pré-incubation de l'arche ouverte avec l'ADNdb circulaire ce qui permet la liaison. Par la suite, incubation avec de l'ATPyS pour provoquer la fermeture de l'arche. Dans ce cas, il y a liaison.

Suite aux expériences *in vitro*, des expériences *in vivo* peuvent être réalisées afin de démontrer une liaison topologique de façon physiologique [411]. Ce type d'expérience repose sur l'introduction d'un mini chromosome artificiel dans la levure *S. cerevisiae*. Ensuite, en utilisant une IP contre le complexe Smc5-6, il est possible de vérifier si le mini-chromosome précipite aussi. Ce cas de figure démontre l'existence d'un lien de type topologique au niveau du complexe Smc5-6. Néanmoins, la présence du nucléosome pourrait invalider cette expérience.

L'utilisation d'ADNdb nue constitue la faiblesse de ces expériences *in vitro*. Normalement, dans la cellule, l'ADNdb est présent sous forme de chromatine, ce qui signifie que l'ADNdb est enroulé autour d'un nucléosome. La présence d'un nucléosome peut empêcher la liaison à l'ADN d'une protéine ou en altérer la liaison [420]. Ainsi, pour le complexe Smc5-6, il est important de déterminer si ce dernier peut lier la chromatine. Par conséquent, la chromatine doit être créée *in vitro* pour permettre de tester la liaison du dimère Smc5-6 [420].

5.3) Interaction entre l'ADNs_b et le complexe Smc5-6

La localisation du complexe Smc5-6 aux endroits contenant de l'ADNs_b est bien établie dans la littérature. L'ADNs_b apparaît de façon transitoire durant plusieurs processus cellulaires tel que la réplication et la réparation de l'ADN [418, 419]. Toutefois, en raison de sa structure simple brin, ce type d'ADN est sensible à la dégradation enzymatique et à la formation de structures secondaires. Pour éviter que ces situations ne surviennent, le complexe RPA, qui possède une forte affinité (10^{-9} à 10^{-11} molaire) pour l'ADNs_b, la lie rapidement [421, 422]. Pour établir un ordre de grandeur, le complexe Smc5-6 possède une affinité de 10^{-8} molaires pour cet ADN. Il est donc peu probable, en termes d'affinité, que le complexe Smc5-6 puisse établir une liaison avec l'ADNs_b avant le complexe RPA. Afin de mieux saisir l'impact de la localisation du complexe Smc5-6, il est important d'étudier sa liaison à l'ADNs_b en présence du complexe RPA.

L'analyse du processus de réparation de l'ADN par homologie de séquence fourni une piste de réponse. Au cours de ce type de réparation, RPA doit être remplacé par Rad51 sur l'ADNsb pour permettre l'invasion de la séquence homologue. Or l'affinité de Rad51 pour l'ADNsb est de 10^{-7} molaires, ce qui est largement inférieur à l'affinité du complexe RPA. Ainsi, pour déplacer RPA de l'ADNsb, Rad51 doit interagir avec un médiateur, Rad52 [423-425]. Ce médiateur créé un pont entre le complexe RPA et Rad51 afin de permettre l'échange (figure 5.2). L'interaction entre le complexe RPA et Rad52 est médiée par la sous-unité Rfa2/RPA32 et nécessite la présence d'une hélice α chargée positivement sur la protéine Rad52 [426, 427]. En plus de Rfa2/RPA32, la partie N-terminale de Rfa1/RPA70 peut aussi servir de plateforme d'ancrage pour certaines protéines impliquées dans la réparation de l'ADN [308, 428]. Cette interaction est médiée par la présence d'une hélice α chargée négativement. Par conséquent, de telles structures peuvent aussi être présentes sur le complexe Smc5-6. Afin de tester cette hypothèse, une étude de localisation du complexe Smc5-6 dans une souche de levure contenant le mutant *rfa1-t11* semble pertinente. Ce mutant possède une substitution K45E dans la partie N-terminale de Rfa1/RPA70 qui peut diminuer la survie des cellules après une exposition aux UV ou au MMS et augmenter l'instabilité du génome [429-431]. Ces phénotypes sont très semblables à ceux rencontrés chez les mutants du complexe Smc5-6 et sont imputés à une interaction déficiente entre Rfa1/RPA70 et la protéine Rad52.

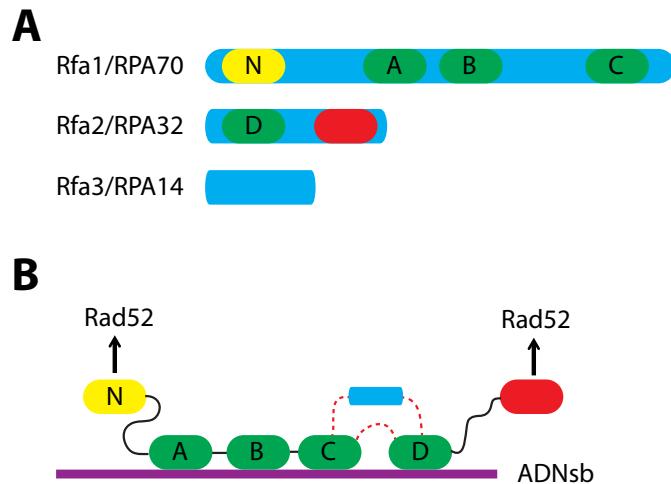


Figure 5.2

A) Représentation schématique des trois protéines composant le complexe RPA. Les régions vertes représentent les sites de liaison à l'ADN_{sb} alors que ceux en rouge et jaune sont les sites d'interaction protéines-protéines. B) Représentation schématique de la liaison à l'ADN_{sb} du complexe RPA. Les lignes pointillées en rouge représentent les interactions entre les membres du complexe.

Il est possible qu'aucune interaction directe n'existe entre RPA et le complexe Smc5-6. Selon cette hypothèse, à la place d'entrer en compétition avec RPA, le complexe Smc5-6 pourrait s'associer avec l'ADN_{sb} liée par RPA. Cette supposition est basée sur le fait qu'à saturation, le complexe RPA lie l'ADN_{sb} à tous les 90 à 100 nts (figure 5.3) [432]. Sachant que le site réel de liaison à l'ADN_{sb} mesure environ 30 nts, il est possible de déterminer que 60 à 70 nts demeurent libres entre deux complexes RPA [421, 422]. Cette longueur est suffisante pour permettre la liaison du dimère Smc5-6 HS qui nécessite 45 à 60 nts pour établir une liaison stable.

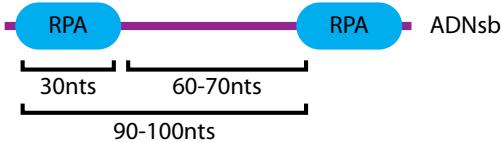


Figure 5.3

Liaison de RPA à l'ADN_{sb}.

Pour confirmer cette hypothèse, un essai de liaison à l'ADN_{sb} s'avère essentiel. Cette expérience se divise en deux étapes, la première consistant en l'incubation de l'ADN_{sb} en présence du complexe RPA avant d'ajouter le dimère Smc5-6 HS. Après migration sur gel, il est possible de déterminer si les deux complexes lient l'ADN_{sb} simultanément. Si cette expérience s'avère positive, le même genre d'expérience peut être réalisé *in vivo*. À cette fin, une souche de levure, contenant le site de clivage de la méga nucléase HO au rDNA, ainsi qu'un plasmide pour contrôler l'expression de cette enzyme sont utilisés. Après induction du DSB au rDNA, quelques échantillons de cellule peuvent être prélevés pour déterminer s'il y a IP du complexe Smc5-6 et co-IP du complexe RPA. À des fins de contrôle, la même expérience doit être menée en incluant une digestion enzymatique de l'ADN avant l'IP pour s'assurer que l'ADN_{sb} permet bien la co-IP du complexe RPA.

5.4) Impact du dimère Nse5-6 sur l'ouverture du «hinge» de Smc5-6

Dans la littérature, il est bien établi que l'association du complexe cohésine avec l'ADN requiert l'ouverture de l'anneau [82]. Cette ouverture est médiée par le complexe de chargement Scc2-Scc4 [190, 261]. Les protéines Scc2-Scc4 permettent ainsi l'ouverture du

domaine «hinge» chez cohésine [266]. Il est aussi reconnu que le complexe Scc2-Scc4 permette le chargement du complexe Smc5-6 sur l'ADN [176]. Ce chargement se doit d'être réalisé par le domaine «hinge». Pourtant, chez *S. cerevisiae*, ce domaine est constamment associé aux protéines Nse5-Nse6. Ces deux protéines peuvent donc interférer avec l'ouverture du «hinge» en raison de leur position sur le complexe Smc5-6.

La protéine Nse6 contient plusieurs motifs HEAT associés à des interactions protéine-protéine. Scc2 est une protéine qui contient le même genre de motif [174, 433]. Ainsi, par une interaction protéine-protéine, il se peut que Nse6 participe à l'association du complexe Smc5-6 avec le complexe de chargement Scc2-Scc4. Cette hypothèse évoque l'interaction entre le complexe Smc5-6 (Nse6) et la protéine Rtt107 [434]. Cette interaction semble aussi essentielle à la localisation du complexe Smc5-6 au DSB (figure5.4). Par conséquent, une interaction entre Nse6 et Scc2 est fortement possible et placerait le complexe de chargement en bonne position pour créer une ouverture au niveau du domaine «hinge». Le fait que l'interaction entre Scc2 et Nse6 soit responsable de la localisation, mais que l'ouverture du domaine «hinge» soit effectuée par les sous-unités Nse5-6 du complexe Smc5-6, constitue une autre possibilité. Afin de vérifier ces suppositions, il est important de déterminer si Nse6 peut interagir avec Scc2. Dans le cas du complexe cohésine, pour confirmer cette interaction, une co-IP fut faite entre les deux complexes [50, 435]. Il serait donc possible de faire la même chose avec le complexe Smc5-6.

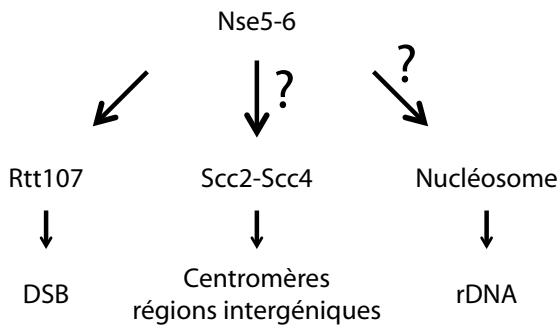


Figure 5.4

Représentation schématique de l'implication possible du dimère Nse5-6 dans la localisation du complexe Smc5-6 aux centromères, aux régions intergéniques et au rDNA.

Cette hypothèse présente cependant une faille très importante puisque le complexe Smc5-6 peut s'associer avec l'ADN sans avoir recourt au complexe de chargement Scc2-Scc4. Cette activité de chargement est possible au niveau du rDNA [176]. Cette partie du génome est caractérisée par la présence d'hétérochromatine. Par conséquent, l'octamère d'histones est faiblement acétylé. De plus, le motif HEAT peut aussi interagir avec des constituants de la matrice nucléaire telle que la queue des histones [172]. De ce point de vue, serait-il possible que Nse6 interagisse avec la queue des histones au niveau du rDNA pour faciliter l'association du complexe Smc5-6? Pour vérifier cette hypothèse, la capacité d'interaction du dimère Nse5-Nse6 avec un nucléosome doit être déterminée. Après la purification du dimère Nse5-6 et la création de chromatine à partir d'octamère d'histone et d'ADNdb, un essai EMSA peut être utilisé pour déterminer la capacité du dimère Nse5-6 à lier ou non un

nucléosome. Pour bien contrôler cette expérience, il est important de tester la liaison du dimère Nse5-6 à l'ADNdb nue.

5.5) Conclusion

Jusqu'à maintenant, l'étude du complexe Smc5-6 avait été principalement réalisée grâce à la caractérisation phénotypique de différents mutants. Ainsi, il fut démontré que le complexe Smc5-6 est impliqué dans le maintien de l'intégrité génomique. Cependant, cette caractérisation comprenait une importante lacune : le manque d'information biochimique au sujet du complexe Smc5-6. Les activités biochimiques de ce complexe l'impliquant dans le maintien de l'intégrité génomique demeuraient encore inconnues. Par l'étude de la liaison à l'ADN des protéines Smc5 et Smc6 sous forme de monomère ou d'hétérodimère, cette thèse apporte des réponses intéressantes et ouvre la porte à encore plus d'expériences enrichissantes dans ce domaine.

6.0) Bibliographie

1. Lindahl, T., *Instability and decay of the primary structure of DNA*. Nature, 1993. **362**(6422): p. 709-15.
2. Ciccia, A. and S.J. Elledge, *The DNA damage response: making it safe to play with knives*. Molecular cell, 2010. **40**(2): p. 179-204.
3. Fairhead, C. and B. Dujon, *Consequences of unique double-stranded breaks in yeast chromosomes: death or homozygosis*. Molecular & general genetics, 1993. **240**(2): p. 170-8.
4. VanHulle, K., et al., *Inverted DNA repeats channel repair of distant double-strand breaks into chromatid fusions and chromosomal rearrangements*. Molecular and cellular biology, 2007. **27**(7): p. 2601-14.
5. Schatz, D.G., M.A. Oettinger, and D. Baltimore, *The V(D)J recombination activating gene, RAG-1*. Cell, 1989. **59**(6): p. 1035-48.
6. Schlissel, M., et al., *Double-strand signal sequence breaks in V(D)J recombination are blunt, 5'-phosphorylated, RAG-dependent, and cell cycle regulated*. Genes & development, 1993. **7**(12B): p. 2520-32.
7. Weinert, T.A. and L.H. Hartwell, *The RAD9 gene controls the cell cycle response to DNA damage in Saccharomyces cerevisiae*. Science, 1988. **241**(4863): p. 317-22.
8. Weinert, T.A. and L.H. Hartwell, *Characterization of RAD9 of Saccharomyces cerevisiae and evidence that its function acts posttranslationally in cell cycle arrest after DNA damage*. Molecular and cellular biology, 1990. **10**(12): p. 6554-64.
9. Weinert, T.A. and L.H. Hartwell, *Cell cycle arrest of cdc mutants and specificity of the RAD9 checkpoint*. Genetics, 1993. **134**(1): p. 63-80.
10. Weinert, T.A., G.L. Kiser, and L.H. Hartwell, *Mitotic checkpoint genes in budding yeast and the dependence of mitosis on DNA replication and repair*. Genes & development, 1994. **8**(6): p. 652-65.
11. Paulovich, A.G. and L.H. Hartwell, *A checkpoint regulates the rate of progression through S phase in S. cerevisiae in response to DNA damage*. Cell, 1995. **82**(5): p. 841-7.
12. Gobe, G.C., et al., *Cell death by apoptosis following X-irradiation of the foetal and neonatal rat kidney*. International journal of radiation biology, 1988. **54**(4): p. 567-76.
13. Sandell, L.L. and V.A. Zakian, *Loss of a yeast telomere: arrest, recovery, and chromosome loss*. Cell, 1993. **75**(4): p. 729-39.
14. Toczyski, D.P., D.J. Galgoczy, and L.H. Hartwell, *CDC5 and CKII control adaptation to the yeast DNA damage checkpoint*. Cell, 1997. **90**(6): p. 1097-106.
15. Larionov, V.L., et al., *A mutant of Saccharomyces cerevisiae with impaired maintenance of centromeric plasmids*. Current genetics, 1985. **10**(1): p. 15-20.
16. Alani, E., S. Subbiah, and N. Kleckner, *The yeast RAD50 gene encodes a predicted 153-kD protein containing a purine nucleotide-binding domain and two large heptad-repeat regions*. Genetics, 1989. **122**(1): p. 47-57.
17. Hirano, T. and T.J. Mitchison, *A heterodimeric coiled-coil protein required for mitotic chromosome condensation in vitro*. Cell, 1994. **79**(3): p. 449-58.
18. Strunnikov, A.V., V.L. Larionov, and D. Koshland, *SMC1: an essential yeast gene encoding a putative head-rod-tail protein is required for nuclear division and*

- defines a new ubiquitous protein family.* The Journal of cell biology, 1993. **123**(6 Pt 2): p. 1635-48.
19. Taylor, E.M., et al., *Characterization of a novel human SMC heterodimer homologous to the Schizosaccharomyces pombe Rad18/Spr18 complex.* Molecular biology of the cell, 2001. **12**(6): p. 1583-94.
 20. Lieb, J.D., et al., *MIX-1: an essential component of the C. elegans mitotic machinery executes X chromosome dosage compensation.* Cell, 1998. **92**(2): p. 265-77.
 21. Hirano, M. and T. Hirano, *ATP-dependent aggregation of single-stranded DNA by a bacterial SMC homodimer.* EMBO journal, 1998. **17**(23): p. 7139-48.
 22. Melby, T.E., et al., *The symmetrical structure of structural maintenance of chromosomes (SMC) and MukB proteins: long, antiparallel coiled coils, folded at a flexible hinge.* The Journal of cell biology, 1998. **142**(6): p. 1595-604.
 23. Tanaka, T., et al., *Identification of cohesin association sites at centromeres and along chromosome arms.* Cell, 1999. **98**(6): p. 847-58.
 24. Saka, Y., et al., *Fission yeast cut3 and cut14, members of a ubiquitous protein family, are required for chromosome condensation and segregation in mitosis.* EMBO journal, 1994. **13**(20): p. 4938-52.
 25. Lehmann, A.R., et al., *The rad18 gene of Schizosaccharomyces pombe defines a new subgroup of the SMC superfamily involved in DNA repair.* Molecular and cellular biology, 1995. **15**(12): p. 7067-80.
 26. Hirano, T., *At the heart of the chromosome: SMC proteins in action.* Nature reviews. Molecular cell biology, 2006. **7**(5): p. 311-22.
 27. Griese, J.J., G. Witte, and K.P. Hopfner, *Structure and DNA binding activity of the mouse condensin hinge domain highlight common and diverse features of SMC proteins.* Nucleic acids research, 2010. **38**(10): p. 3454-65.
 28. Losada, A. and T. Hirano, *Dynamic molecular linkers of the genome: the first decade of SMC proteins.* Genes & development, 2005. **19**(11): p. 1269-87.
 29. Haering, C.H., et al., *Molecular architecture of SMC proteins and the yeast cohesin complex.* Molecular cell, 2002. **9**(4): p. 773-88.
 30. Hirano, M. and T. Hirano, *Hinge-mediated dimerization of SMC protein is essential for its dynamic interaction with DNA.* EMBO journal, 2002. **21**(21): p. 5733-44.
 31. Saitoh, N., et al., *ScII: an abundant chromosome scaffold protein is a member of a family of putative ATPases with an unusual predicted tertiary structure.* The Journal of cell biology, 1994. **127**(2): p. 303-18.
 32. Chiu, A., E. Revenkova, and R. Jessberger, *DNA interaction and dimerization of eukaryotic SMC hinge domains.* The Journal of biological chemistry, 2004. **279**(25): p. 26233-42.
 33. Griese, J.J. and K.P. Hopfner, *Structure and DNA-binding activity of the Pyrococcus furiosus SMC protein hinge domain.* Proteins, 2011. **79**(2): p. 558-68.
 34. Ku, B., et al., *Crystal structure of the MukB hinge domain with coiled-coil stretches and its functional implications.* Proteins, 2010. **78**(6): p. 1483-90.
 35. Li, Y., et al., *The crystal structure of the hinge domain of the Escherichia coli structural maintenance of chromosomes protein MukB.* Journal of molecular biology, 2010. **395**(1): p. 11-9.

36. Kurze, A., et al., *A positively charged channel within the Smc1/Smc3 hinge required for sister chromatid cohesion*. EMBO journal, 2011. **30**(2): p. 364-78.
37. Hirano, M., et al., *Bimodal activation of SMC ATPase by intra- and inter-molecular interactions*. EMBO journal, 2001. **20**(12): p. 3238-50.
38. Mishra, A., et al., *Both interaction surfaces within cohesin's hinge domain are essential for its stable chromosomal association*. Current biology, 2010. **20**(4): p. 279-89.
39. Sergeant, J., et al., *Composition and architecture of the Schizosaccharomyces pombe Rad18 (Smc5-6) complex*. Molecular and cellular biology, 2005. **25**(1): p. 172-84.
40. Hopfner, K.P. and J.A. Tainer, *Rad50/SMC proteins and ABC transporters: unifying concepts from high-resolution structures*. Current opinion in structural biology, 2003. **13**(2): p. 249-55.
41. Higgins, C.F., *ABC transporters: from microorganisms to man*. Annual review of cell biology, 1992. **8**: p. 67-113.
42. Holland, I.B. and M.A. Blight, *ABC-ATPases, adaptable energy generators fuelling transmembrane movement of a variety of molecules in organisms from bacteria to humans*. Journal of molecular biology, 1999. **293**(2): p. 381-99.
43. Schmitt, L. and R. Tampe, *Structure and mechanism of ABC transporters*. Current opinion in structural biology, 2002. **12**(6): p. 754-60.
44. Aravind, L., D.R. Walker, and E.V. Koonin, *Conserved domains in DNA repair proteins and evolution of repair systems*. Nucleic acids research, 1999. **27**(5): p. 1223-42.
45. Hopfner, K.P., et al., *Structural biology of Rad50 ATPase: ATP-driven conformational control in DNA double-strand break repair and the ABC-ATPase superfamily*. Cell, 2000. **101**(7): p. 789-800.
46. Hung, L.W., et al., *Crystal structure of the ATP-binding subunit of an ABC transporter*. Nature, 1998. **396**(6712): p. 703-7.
47. Locher, K.P., A.T. Lee, and D.C. Rees, *The E. coli BtuCD structure: a framework for ABC transporter architecture and mechanism*. Science, 2002. **296**(5570): p. 1091-8.
48. Lowe, J., S.C. Cordell, and F. van den Ent, *Crystal structure of the SMC head domain: an ABC ATPase with 900 residues antiparallel coiled-coil inserted*. Journal of molecular biology, 2001. **306**(1): p. 25-35.
49. Obmolova, G., et al., *Crystal structures of mismatch repair protein MutS and its complex with a substrate DNA*. Nature, 2000. **407**(6805): p. 703-10.
50. Arumugam, P., et al., *ATP hydrolysis is required for cohesin's association with chromosomes*. Current biology, 2003. **13**(22): p. 1941-53.
51. Hirano, M. and T. Hirano, *Positive and negative regulation of SMC-DNA interactions by ATP and accessory proteins*. EMBO journal, 2004. **23**(13): p. 2664-73.
52. Jessberger, R., et al., *SMC proteins constitute two subunits of the mammalian recombination complex RC-1*. EMBO journal, 1996. **15**(15): p. 4061-8.
53. Kimura, K. and T. Hirano, *ATP-dependent positive supercoiling of DNA by 13S condensin: a biochemical implication for chromosome condensation*. Cell, 1997. **90**(4): p. 625-34.

54. Sutani, T. and M. Yanagida, *DNA renaturation activity of the SMC complex implicated in chromosome condensation*. Nature, 1997. **388**(6644): p. 798-801.
55. Stray, J.E. and J.E. Lindsley, *Biochemical analysis of the yeast condensin Smc2/4 complex: an ATPase that promotes knotting of circular DNA*. The Journal of biological chemistry, 2003. **278**(28): p. 26238-48.
56. Jones, P.M. and A.M. George, *Subunit interactions in ABC transporters: towards a functional architecture*. FEMS microbiology letters, 1999. **179**(2): p. 187-202.
57. Schmees, G., et al., *Functional consequences of mutations in the conserved 'signature sequence' of the ATP-binding-cassette protein MalK*. European journal of biochemistry / FEBS, 1999. **266**(2): p. 420-30.
58. Smith, P.C., et al., *ATP binding to the motor domain from an ABC transporter drives formation of a nucleotide sandwich dimer*. Molecular cell, 2002. **10**(1): p. 139-49.
59. Ambudkar, S.V., et al., *The A-loop, a novel conserved aromatic acid subdomain upstream of the Walker A motif in ABC transporters, is critical for ATP binding*. FEBS Letters, 2006. **580**(4): p. 1049-55.
60. Carrier, I., et al., *Mutational analysis of conserved aromatic residues in the A-loop of the ABC transporter ABCB1A (mouse Mdr3)*. FEBS Letters, 2007. **581**(2): p. 301-8.
61. Lammens, A., A. Schele, and K.P. Hopfner, *Structural biochemistry of ATP-driven dimerization and DNA-stimulated activation of SMC ATPases*. Current biology, 2004. **14**(19): p. 1778-82.
62. Lammens, K., et al., *The Mre11:Rad50 structure shows an ATP-dependent molecular clamp in DNA double-strand break repair*. Cell, 2011. **145**(1): p. 54-66.
63. Lammens, A. and K.P. Hopfner, *Structural basis for adenylate kinase activity in ABC ATPases*. Journal of molecular biology, 2010. **401**(2): p. 265-73.
64. Bhaskara, V., et al., *Rad50 adenylate kinase activity regulates DNA tethering by Mre11/Rad50 complexes*. Molecular cell, 2007. **25**(5): p. 647-61.
65. Williams, R.S. and J.A. Tainer, *Learning our ABCs: Rad50 directs MRN repair functions via adenylate kinase activity from the conserved ATP binding cassette*. Molecular cell, 2007. **25**(6): p. 789-91.
66. Graumann, P.L. and T. Knust, *Dynamics of the bacterial SMC complex and SMC-like proteins involved in DNA repair*. Chromosome research, 2009. **17**(2): p. 265-75.
67. Lim, J.H. and B.H. Oh, *Structural and functional similarities between two bacterial chromosome compacting machineries*. Biochemical and biophysical research communications, 2009. **386**(3): p. 415-9.
68. Niki, H., et al., *The new gene mukB codes for a 177 kd protein with coiled-coil domains involved in chromosome partitioning of E. coli*. EMBO journal, 1991. **10**(1): p. 183-93.
69. Yamazoe, M., et al., *Complex formation of MukB, MukE and MukF proteins involved in chromosome partitioning in Escherichia coli*. EMBO journal, 1999. **18**(21): p. 5873-84.
70. Britton, R.A., D.C. Lin, and A.D. Grossman, *Characterization of a prokaryotic SMC protein involved in chromosome partitioning*. Genes & development, 1998. **12**(9): p. 1254-9.

71. Graumann, P.L., R. Losick, and A.V. Strunnikov, *Subcellular localization of Bacillus subtilis SMC, a protein involved in chromosome condensation and segregation*. Journal of bacteriology, 1998. **180**(21): p. 5749-55.
72. Moriya, S., et al., *A Bacillus subtilis gene-encoding protein homologous to eukaryotic SMC motor protein is necessary for chromosome partition*. Molecular microbiology, 1998. **29**(1): p. 179-87.
73. Mascarenhas, J., et al., *Cell cycle-dependent localization of two novel prokaryotic chromosome segregation and condensation proteins in Bacillus subtilis that interact with SMC protein*. EMBO journal, 2002. **21**(12): p. 3108-18.
74. Soppa, J., et al., *Discovery of two novel families of proteins that are proposed to interact with prokaryotic SMC proteins, and characterization of the Bacillus subtilis family members ScpA and ScpB*. Molecular microbiology, 2002. **45**(1): p. 59-71.
75. Chen, N., et al., *ATP-induced shrinkage of DNA with MukB protein and the MukBEF complex of Escherichia coli*. Journal of bacteriology, 2008. **190**(10): p. 3731-7.
76. Woo, J.S., et al., *Structural studies of a bacterial condensin complex reveal ATP-dependent disruption of intersubunit interactions*. Cell, 2009. **136**(1): p. 85-96.
77. Niki, H., et al., *E.coli MukB protein involved in chromosome partition forms a homodimer with a rod-and-hinge structure having DNA binding and ATP/GTP binding activities*. EMBO journal, 1992. **11**(13): p. 5101-9.
78. Petrushenko, Z.M., et al., *DNA reshaping by MukB. Right-handed knotting, left-handed supercoiling*. The Journal of biological chemistry, 2006. **281**(8): p. 4606-15.
79. Petrushenko, Z.M., C.H. Lai, and V.V. Rybenkov, *Antagonistic interactions of kleisins and DNA with bacterial Condensin MukB*. The Journal of biological chemistry, 2006. **281**(45): p. 34208-17.
80. Cui, Y., Z.M. Petrushenko, and V.V. Rybenkov, *MukB acts as a macromolecular clamp in DNA condensation*. Nature structural & molecular biology, 2008. **15**(4): p. 411-8.
81. Hirano, M. and T. Hirano, *Opening closed arms: long-distance activation of SMC ATPase by hinge-DNA interactions*. Molecular cell, 2006. **21**(2): p. 175-86.
82. Haering, C.H., et al., *The cohesin ring concatenates sister DNA molecules*. Nature, 2008. **454**(7202): p. 297-301.
83. Uhlmann, F., et al., *Cleavage of cohesin by the CD clan protease separin triggers anaphase in yeast*. Cell, 2000. **103**(3): p. 375-86.
84. Lavoie, B.D., E. Hogan, and D. Koshland, *In vivo requirements for rDNA chromosome condensation reveal two cell-cycle-regulated pathways for mitotic chromosome folding*. Genes & development, 2004. **18**(1): p. 76-87.
85. St-Pierre, J., et al., *Polo kinase regulates mitotic chromosome condensation by hyperactivation of condensin DNA supercoiling activity*. Molecular cell, 2009. **34**(4): p. 416-26.
86. Heale, J.T., et al., *Condensin I interacts with the PARP-1-XRCC1 complex and functions in DNA single-strand break repair*. Molecular cell, 2006. **21**(6): p. 837-48.
87. Heidinger-Pauli, J.M., et al., *Systematic reduction of cohesin differentially affects chromosome segregation, condensation, and DNA repair*. Current biology, 2010. **20**(10): p. 957-63.

88. Sakamoto, T., et al., *Condensin II alleviates DNA damage and is essential for tolerance of boron overload stress in Arabidopsis*. The Plant cell, 2011. **23**(9): p. 3533-46.
89. Sjogren, C. and K. Nasmyth, *Sister chromatid cohesion is required for postreplicative double-strand break repair in *Saccharomyces cerevisiae**. Current biology, 2001. **11**(12): p. 991-5.
90. De Piccoli, G., J. Torres-Rosell, and L. Aragon, *The unnamed complex: what do we know about Smc5-Smc6?* Chromosome research, 2009. **17**(2): p. 251-63.
91. Gruber, S., C.H. Haering, and K. Nasmyth, *Chromosomal cohesin forms a ring*. Cell, 2003. **112**(6): p. 765-77.
92. Kulemzina, I., et al., *Cohesin rings devoid of Scc3 and Pds5 maintain their stable association with the DNA*. PLoS genetics, 2012. **8**(8): p. e1002856.
93. Weitzer, S., C. Lehane, and F. Uhlmann, *A model for ATP hydrolysis-dependent binding of cohesin to DNA*. Current biology, 2003. **13**(22): p. 1930-40.
94. Haering, C.H., et al., *Structure and stability of cohesin's Smc1-kleisin interaction*. Molecular cell, 2004. **15**(6): p. 951-64.
95. Arumugam, P., et al., *Cohesin's ATPase activity is stimulated by the C-terminal Winged-Helix domain of its kleisin subunit*. Current biology, 2006. **16**(20): p. 1998-2008.
96. Losada, A., M. Hirano, and T. Hirano, *Identification of Xenopus SMC protein complexes required for sister chromatid cohesion*. Genes & development, 1998. **12**(13): p. 1986-97.
97. Losada, A. and T. Hirano, *Intermolecular DNA interactions stimulated by the cohesin complex in vitro: implications for sister chromatid cohesion*. Current biology, 2001. **11**(4): p. 268-72.
98. Sakai, A., et al., *Condensin but not cohesin SMC heterodimer induces DNA reannealing through protein-protein assembly*. EMBO journal, 2003. **22**(11): p. 2764-75.
99. Sun, M., T. Nishino, and J.F. Marko, *The SMC1-SMC3 cohesin heterodimer structures DNA through supercoiling-dependent loop formation*. Nucleic acids research, 2013. **41**(12): p. 6149-60.
100. Onn, I., et al., *Reconstitution and subunit geometry of human condensin complexes*. EMBO journal, 2007. **26**(4): p. 1024-34.
101. Kimura, K. and T. Hirano, *Dual roles of the 11S regulatory subcomplex in condensin functions*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2000. **97**(22): p. 11972-7.
102. Hudson, D.F., et al., *Molecular and genetic analysis of condensin function in vertebrate cells*. Molecular biology of the cell, 2008. **19**(7): p. 3070-9.
103. Yoshimura, S.H., et al., *Condensin architecture and interaction with DNA: regulatory non-SMC subunits bind to the head of SMC heterodimer*. Current biology, 2002. **12**(6): p. 508-13.
104. Stray, J.E., et al., *The *Saccharomyces cerevisiae* Smc2/4 condensin compacts DNA into (+) chiral structures without net supercoiling*. The Journal of biological chemistry, 2005. **280**(41): p. 34723-34.

105. Kimura, K., et al., *13S condensin actively reconfigures DNA by introducing global positive writhe: implications for chromosome condensation*. Cell, 1999. **98**(2): p. 239-48.
106. Bazett-Jones, D.P., K. Kimura, and T. Hirano, *Efficient supercoiling of DNA by a single condensin complex as revealed by electron spectroscopic imaging*. Molecular cell, 2002. **9**(6): p. 1183-90.
107. Kimura, K., O. Cuvier, and T. Hirano, *Chromosome condensation by a human condensin complex in Xenopus egg extracts*. The Journal of biological chemistry, 2001. **276**(8): p. 5417-20.
108. Strick, T.R., T. Kawaguchi, and T. Hirano, *Real-time detection of single-molecule DNA compaction by condensin I*. Current biology, 2004. **14**(10): p. 874-80.
109. Duan, X., et al., *Structural and functional insights into the roles of the Mms21 subunit of the Smc5/6 complex*. Molecular cell, 2009. **35**(5): p. 657-68.
110. Duan, X., et al., *Architecture of the Smc5/6 Complex of Saccharomyces cerevisiae Reveals a Unique Interaction between the Nse5-6 Subcomplex and the Hinge Regions of Smc5 and Smc6*. The Journal of biological chemistry, 2009. **284**(13): p. 8507-15.
111. Pebernard, S., et al., *Nse1 RING-like domain supports functions of the Smc5-Smc6 holocomplex in genome stability*. Molecular biology of the cell, 2008. **19**(10): p. 4099-109.
112. Pebernard, S., et al., *The Nse5-Nse6 dimer mediates DNA repair roles of the Smc5-Smc6 complex*. Molecular and cellular biology, 2006. **26**(5): p. 1617-30.
113. Nasim, A. and B.P. Smith, *Genetic control of radiation sensitivity in Schizosaccharomyces pombe*. Genetics, 1975. **79**(4): p. 573-82.
114. Verkade, H.M., et al., *Rad18 is required for DNA repair and checkpoint responses in fission yeast*. Molecular biology of the cell, 1999. **10**(9): p. 2905-18.
115. Fousteri, M.I. and A.R. Lehmann, *A novel SMC protein complex in Schizosaccharomyces pombe contains the Rad18 DNA repair protein*. EMBO journal, 2000. **19**(7): p. 1691-702.
116. Morikawa, H., et al., *Rad62 protein functionally and physically associates with the smc5/smc6 protein complex and is required for chromosome integrity and recombination repair in fission yeast*. Molecular and cellular biology, 2004. **24**(21): p. 9401-13.
117. Palecek, J., et al., *The Smc5-Smc6 DNA repair complex. bridging of the Smc5-Smc6 heads by the KLEISIN, Nse4, and non-Kleisin subunits*. The Journal of biological chemistry, 2006. **281**(48): p. 36952-9.
118. Bavner, A., et al., *EID3 is a novel EID family member and an inhibitor of CBP-dependent co-activation*. Nucleic acids research, 2005. **33**(11): p. 3561-9.
119. Taylor, E.M., et al., *Identification of the proteins, including MAGEG1, that make up the human SMC5-6 protein complex*. Molecular and cellular biology, 2008. **28**(4): p. 1197-206.
120. Guerineau, M., et al., *Analysis of the Nse3/MAGE-binding domain of the Nse4/EID family proteins*. PloS one, 2012. **7**(4): p. e35813.

121. Hudson, J.J., et al., *Interactions between the Nse3 and Nse4 components of the SMC5-6 complex identify evolutionarily conserved interactions between MAGE and EID Families*. PloS one, 2011. **6**(2): p. e17270.
122. Pebernard, S., et al., *Nse1, Nse2, and a novel subunit of the Smc5-Smc6 complex, Nse3, play a crucial role in meiosis*. Molecular biology of the cell, 2004. **15**(11): p. 4866-76.
123. Barker, P.A. and A. Salehi, *The MAGE proteins: emerging roles in cell cycle progression, apoptosis, and neurogenetic disease*. Journal of neuroscience research, 2002. **67**(6): p. 705-12.
124. Fujioka, Y., et al., *Identification of a novel non-structural maintenance of chromosomes (SMC) component of the SMC5-SMC6 complex involved in DNA repair*. The Journal of biological chemistry, 2002. **277**(24): p. 21585-91.
125. Santa Maria, S.R., et al., *Requirement of Nse1, a subunit of the Smc5-Smc6 complex, for Rad52-dependent postreplication repair of UV-damaged DNA in Saccharomyces cerevisiae*. Molecular and cellular biology, 2007. **27**(23): p. 8409-18.
126. Doyle, J.M., et al., *MAGE-RING protein complexes comprise a family of E3 ubiquitin ligases*. Molecular cell, 2010. **39**(6): p. 963-74.
127. Andrews, E.A., et al., *Nse2, a component of the Smc5-6 complex, is a SUMO ligase required for the response to DNA damage*. Molecular and cellular biology, 2005. **25**(1): p. 185-96.
128. Potts, P.R. and H. Yu, *Human MMS21/NSE2 is a SUMO ligase required for DNA repair*. Molecular and cellular biology, 2005. **25**(16): p. 7021-32.
129. Zhao, X. and G. Blobel, *A SUMO ligase is part of a nuclear multiprotein complex that affects DNA repair and chromosomal organization*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2005. **102**(13): p. 4777-82.
130. Potts, P.R., *The Yin and Yang of the MMS21-SMC5/6 SUMO ligase complex in homologous recombination*. DNA repair, 2009. **8**(4): p. 499-506.
131. Duan, X., W.B. Holmes, and H. Ye, *Interaction mapping between Saccharomyces cerevisiae Smc5 and SUMO E3 ligase Mms21*. Biochemistry, 2011. **50**(46): p. 10182-8.
132. Kliszcak, M., et al., *SUMO ligase activity of vertebrate Mms21/Nse2 is required for efficient DNA repair but not for Smc5/6 complex stability*. DNA repair, 2012. **11**(10): p. 799-810.
133. Yong-Gonzales, V., et al., *The Smc5-Smc6 complex regulates recombination at centromeric regions and affects kinetochore protein sumoylation during normal growth*. PloS one, 2012. **7**(12): p. e51540.
134. Rothenbusch, U., et al., *Sumoylation regulates Kap114-mediated nuclear transport*. EMBO journal, 2012. **31**(11): p. 2461-72.
135. Pebernard, S., et al., *Localization of Smc5/6 to centromeres and telomeres requires heterochromatin and SUMO, respectively*. EMBO journal, 2008. **27**(22): p. 3011-23.
136. Potts, P.R. and H. Yu, *The SMC5/6 complex maintains telomere length in ALT cancer cells through SUMOylation of telomere-binding proteins*. Nature structural & molecular biology, 2007. **14**(7): p. 581-90.

137. Potts, P.R., M.H. Porteus, and H. Yu, *Human SMC5/6 complex promotes sister chromatid homologous recombination by recruiting the SMC1/3 cohesin complex to double-strand breaks*. EMBO journal, 2006. **25**(14): p. 3377-88.
138. Wu, N., et al., *Scc1 sumoylation by Mms21 promotes sister chromatid recombination through counteracting Wapl*. Genes & development, 2012. **26**(13): p. 1473-85.
139. McAleenan, A., et al., *SUMOylation of the alpha-kleisin subunit of cohesin is required for DNA damage-induced cohesion*. Current biology, 2012. **22**(17): p. 1564-75.
140. Simpson-Lavy, K.J. and M. Johnston, *SUMOylation regulates the SNF1 protein kinase*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2013. **110**(43): p. 17432-7.
141. Bayer, P., et al., *Structure determination of the small ubiquitin-related modifier SUMO-1*. Journal of molecular biology, 1998. **280**(2): p. 275-86.
142. Mossessova, E. and C.D. Lima, *Ulp1-SUMO crystal structure and genetic analysis reveal conserved interactions and a regulatory element essential for cell growth in yeast*. Molecular cell, 2000. **5**(5): p. 865-76.
143. Bernier-Villamor, V., et al., *Structural basis for E2-mediated SUMO conjugation revealed by a complex between ubiquitin-conjugating enzyme Ubc9 and RanGAP1*. Cell, 2002. **108**(3): p. 345-56.
144. Elmore, Z.C., et al., *Sumo-dependent substrate targeting of the SUMO protease Ulp1*. BMC biology, 2011. **9**: p. 74.
145. Baker, R.T. and P.G. Board, *The human ubiquitin gene family: structure of a gene and pseudogenes from the Ub B subfamily*. Nucleic acids research, 1987. **15**(2): p. 443-63.
146. Ozkaynak, E., et al., *The yeast ubiquitin genes: a family of natural gene fusions*. EMBO journal, 1987. **6**(5): p. 1429-39.
147. Johnson, E.S., et al., *The ubiquitin-like protein Smt3p is activated for conjugation to other proteins by an Aos1p/Uba2p heterodimer*. EMBO journal, 1997. **16**(18): p. 5509-19.
148. Desterro, J.M., et al., *Identification of the enzyme required for activation of the small ubiquitin-like protein SUMO-1*. The Journal of biological chemistry, 1999. **274**(15): p. 10618-24.
149. Pickart, C.M., et al., *Substrate properties of site-specific mutant ubiquitin protein (G76A) reveal unexpected mechanistic features of ubiquitin-activating enzyme (E1)*. The Journal of biological chemistry, 1994. **269**(10): p. 7115-23.
150. Pickart, C.M. and I.A. Rose, *Functional heterogeneity of ubiquitin carrier proteins*. The Journal of biological chemistry, 1985. **260**(3): p. 1573-81.
151. Haas, A.L. and P.M. Bright, *The resolution and characterization of putative ubiquitin carrier protein isozymes from rabbit reticulocytes*. The Journal of biological chemistry, 1988. **263**(26): p. 13258-67.
152. Johnson, E.S. and G. Blobel, *Ubc9p is the conjugating enzyme for the ubiquitin-like protein Smt3p*. The Journal of biological chemistry, 1997. **272**(43): p. 26799-802.
153. Desterro, J.M., J. Thomson, and R.T. Hay, *Ubch9 conjugates SUMO but not ubiquitin*. FEBS letters, 1997. **417**(3): p. 297-300.

154. Reiss, Y., D. Kaim, and A. Hershko, *Specificity of binding of NH₂-terminal residue of proteins to ubiquitin-protein ligase. Use of amino acid derivatives to characterize specific binding sites.* The Journal of biological chemistry, 1988. **263**(6): p. 2693-8.
155. Bartel, B., I. Wunning, and A. Varshavsky, *The recognition component of the N-end rule pathway.* EMBO journal, 1990. **9**(10): p. 3179-89.
156. Hochstrasser, M., *SP-RING for SUMO: new functions bloom for a ubiquitin-like protein.* Cell, 2001. **107**(1): p. 5-8.
157. Baker, R.T., J.W. Tobias, and A. Varshavsky, *Ubiquitin-specific proteases of *Saccharomyces cerevisiae*. Cloning of UBP2 and UBP3, and functional analysis of the UBP gene family.* The Journal of biological chemistry, 1992. **267**(32): p. 23364-75.
158. Li, S.J. and M. Hochstrasser, *A new protease required for cell-cycle progression in yeast.* Nature, 1999. **398**(6724): p. 246-51.
159. Li, S.J. and M. Hochstrasser, *The yeast ULP2 (SMT4) gene encodes a novel protease specific for the ubiquitin-like Smt3 protein.* Molecular and cellular biology, 2000. **20**(7): p. 2367-77.
160. Hochstrasser, M., *Ubiquitin-dependent protein degradation.* Annual review of genetics, 1996. **30**: p. 405-39.
161. Hofmann, R.M. and C.M. Pickart, *Noncanonical MMS2-encoded ubiquitin-conjugating enzyme functions in assembly of novel polyubiquitin chains for DNA repair.* Cell, 1999. **96**(5): p. 645-53.
162. Spence, J., et al., *Cell cycle-regulated modification of the ribosome by a variant multiubiquitin chain.* Cell, 2000. **102**(1): p. 67-76.
163. Sun, Z.W. and C.D. Allis, *Ubiquitination of histone H2B regulates H3 methylation and gene silencing in yeast.* Nature, 2002. **418**(6893): p. 104-8.
164. Stade, K., et al., *A lack of SUMO conjugation affects cNLS-dependent nuclear protein import in yeast.* The Journal of biological chemistry, 2002. **277**(51): p. 49554-61.
165. Ross, S., et al., *SUMO-1 modification represses Sp3 transcriptional activation and modulates its subnuclear localization.* Molecular cell, 2002. **10**(4): p. 831-42.
166. Hong, Y., et al., *Regulation of heat shock transcription factor 1 by stress-induced SUMO-1 modification.* The Journal of biological chemistry, 2001. **276**(43): p. 40263-7.
167. Mao, Y., et al., *SUMO-1 conjugation to topoisomerase I: A possible repair response to topoisomerase-mediated DNA damage.* Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2000. **97**(8): p. 4046-51.
168. Hardeland, U., et al., *Modification of the human thymine-DNA glycosylase by ubiquitin-like proteins facilitates enzymatic turnover.* EMBO journal, 2002. **21**(6): p. 1456-64.
169. Mascle, X.H., et al., *Identification of a non-covalent ternary complex formed by PIAS1, SUMO1, and UBC9 proteins involved in transcriptional regulation.* Journal of biological chemistry, 2013. **288**(51): p. 36312-27.
170. Yan, S., et al., *Salicylic acid activates DNA damage responses to potentiate plant immunity.* Molecular cell, 2013. **52**(4): p. 602-10.
171. Andrade, M.A. and P. Bork, *HEAT repeats in the Huntington's disease protein.* Nature genetics, 1995. **11**(2): p. 115-6.

172. Strahl, B.D. and C.D. Allis, *The language of covalent histone modifications*. Nature, 2000. **403**(6765): p. 41-5.
173. Lee, S.J., et al., *The adoption of a twisted structure of importin-beta is essential for the protein-protein interaction required for nuclear transport*. Journal of molecular biology, 2000. **302**(1): p. 251-64.
174. Neuwald, A.F. and T. Hirano, *HEAT repeats associated with condensins, cohesins, and other complexes involved in chromosome-related functions*. Genome research, 2000. **10**(10): p. 1445-52.
175. Ju, L., et al., *SMC6 is an essential gene in mice, but a hypomorphic mutant in the ATPase domain has a mild phenotype with a range of subtle abnormalities*. DNA repair, 2013. **12**(5): p. 356-66.
176. Lindroos, H.B., et al., *Chromosomal association of the Smc5/6 complex reveals that it functions in differently regulated pathways*. Molecular cell, 2006. **22**(6): p. 755-67.
177. Torres-Rosell, J., et al., *SMC5 and SMC6 genes are required for the segregation of repetitive chromosome regions*. Nature cell biology, 2005. **7**(4): p. 412-9.
178. Schwab, M., et al., *Amplified DNA with limited homology to myc cellular oncogene is shared by human neuroblastoma cell lines and a neuroblastoma tumour*. Nature, 1983. **305**(5931): p. 245-8.
179. Brodeur, G.M., et al., *Amplification of N-myc in untreated human neuroblastomas correlates with advanced disease stage*. Science, 1984. **224**(4653): p. 1121-4.
180. Brodeur, G.M., et al., *Biology and genetics of human neuroblastomas*. Journal of pediatric hematology/oncology, 1997. **19**(2): p. 93-101.
181. Storlazzi, C.T., et al., *Gene amplification as double minutes or homogeneously staining regions in solid tumors: origin and structure*. Genome research, 2010. **20**(9): p. 1198-206.
182. Weber, A., et al., *Coamplification of DDX1 correlates with an improved survival probability in children with MYCN-amplified human neuroblastoma*. Journal of clinical oncology, 2004. **22**(13): p. 2681-90.
183. George, R.E., et al., *Investigation of co-amplification of the candidate genes ornithine decarboxylase, ribonucleotide reductase, syndecan-1 and a DEAD box gene, DDX1, with N-myc in neuroblastoma. United Kingdom Children's Cancer Study Group*. Oncogene, 1996. **12**(7): p. 1583-7.
184. George, R.E., et al., *Analysis of candidate gene co-amplification with MYCN in neuroblastoma*. European journal of cancer, 1997. **33**(12): p. 2037-42.
185. Beheshti, B., et al., *Chromosomal localization of DNA amplifications in neuroblastoma tumors using cDNA microarray comparative genomic hybridization*. Neoplasia, 2003. **5**(1): p. 53-62.
186. Chung, W., et al., *Identification of novel tumor markers in prostate, colon and breast cancer by unbiased methylation profiling*. PloS one, 2008. **3**(4): p. e2079.
187. Solimini, N.L., et al., *Recurrent hemizygous deletions in cancers may optimize proliferative potential*. Science, 2012. **337**(6090): p. 104-9.
188. Ampatzidou, E., et al., *Smc5/6 is required for repair at collapsed replication forks*. Molecular and cellular biology, 2006. **26**(24): p. 9387-401.

189. Tsuyama, T., et al., *Chromatin loading of Smc5/6 is induced by DNA replication but not by DNA double-strand breaks*. Biochemical and biophysical research communications, 2006. **351**(4): p. 935-9.
190. Ciosk, R., et al., *Cohesin's binding to chromosomes depends on a separate complex consisting of Scc2 and Scc4 proteins*. Molecular cell, 2000. **5**(2): p. 243-54.
191. D'Ambrosio, C., et al., *Identification of cis-acting sites for condensin loading onto budding yeast chromosomes*. Genes & development, 2008. **22**(16): p. 2215-27.
192. Luger, K., et al., *Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution*. Nature, 1997. **389**(6648): p. 251-60.
193. Davey, C.A., et al., *Solvent mediated interactions in the structure of the nucleosome core particle at 1.9 Å resolution*. Journal of molecular biology, 2002. **319**(5): p. 1097-113.
194. Rohs, R., et al., *The role of DNA shape in protein-DNA recognition*. Nature, 2009. **461**(7268): p. 1248-53.
195. Luger, K. and T.J. Richmond, *The histone tails of the nucleosome*. Current opinion in genetics & development, 1998. **8**(2): p. 140-6.
196. Corona, D.F., et al., *ISWI regulates higher-order chromatin structure and histone H1 assembly in vivo*. PLoS biology, 2007. **5**(9): p. e232.
197. Robinson, P.J. and D. Rhodes, *Structure of the '30 nm' chromatin fibre: a key role for the linker histone*. Current opinion in structural biology, 2006. **16**(3): p. 336-43.
198. Vincent, J.A., T.J. Kwong, and T. Tsukiyama, *ATP-dependent chromatin remodeling shapes the DNA replication landscape*. Nature structural & molecular biology, 2008. **15**(5): p. 477-84.
199. Zhou, J., et al., *The nucleosome surface regulates chromatin compaction and couples it with transcriptional repression*. Nature structural & molecular biology, 2007. **14**(11): p. 1070-6.
200. Belmont, A.S. and K. Bruce, *Visualization of G1 chromosomes: a folded, twisted, supercoiled chromonema model of interphase chromatid structure*. The Journal of cell biology, 1994. **127**(2): p. 287-302.
201. Moser, S.C. and J.R. Swedlow, *How to be a mitotic chromosome*. Chromosome research, 2011. **19**(3): p. 307-19.
202. Seitan, V.C. and M. Merkenschlager, *Cohesin and chromatin organisation*. Current opinion in genetics & development, 2012. **22**(2): p. 93-100.
203. Finch, J.T. and A. Klug, *Solenoidal model for superstructure in chromatin*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1976. **73**(6): p. 1897-901.
204. Gilbert, N., et al., *Chromatin architecture of the human genome: gene-rich domains are enriched in open chromatin fibers*. Cell, 2004. **118**(5): p. 555-66.
205. Langmore, J.P. and J.R. Paulson, *Low angle x-ray diffraction studies of chromatin structure in vivo and in isolated nuclei and metaphase chromosomes*. Journal of cell biology, 1983. **96**(4): p. 1120-31.
206. Robinson, P.J., et al., *EM measurements define the dimensions of the "30-nm" chromatin fiber: evidence for a compact, interdigitated structure*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2006. **103**(17): p. 6506-11.

207. Schalch, T., et al., *X-ray structure of a tetranucleosome and its implications for the chromatin fibre*. Nature, 2005. **436**(7047): p. 138-41.
208. Widom, J. and A. Klug, *Structure of the 300A chromatin filament: X-ray diffraction from oriented samples*. Cell, 1985. **43**(1): p. 207-13.
209. Woodcock, C.L., L.L. Frado, and J.B. Rattner, *The higher-order structure of chromatin: evidence for a helical ribbon arrangement*. Journal of cell biology, 1984. **99**(1 Pt 1): p. 42-52.
210. Eltsov, M., et al., *Analysis of cryo-electron microscopy images does not support the existence of 30-nm chromatin fibers in mitotic chromosomes in situ*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2008. **105**(50): p. 19732-7.
211. Maeshima, K. and M. Eltsov, *Packaging the genome: the structure of mitotic chromosomes*. Journal of biochemistry, 2008. **143**(2): p. 145-53.
212. McDowall, A.W., J.M. Smith, and J. Dubochet, *Cryo-electron microscopy of vitrified chromosomes in situ*. EMBO journal, 1986. **5**(6): p. 1395-402.
213. Nishino, Y., et al., *Human mitotic chromosomes consist predominantly of irregularly folded nucleosome fibres without a 30-nm chromatin structure*. EMBO journal, 2012. **31**(7): p. 1644-53.
214. Huisenga, K.L., B. Brower-Toland, and S.C. Elgin, *The contradictory definitions of heterochromatin: transcription and silencing*. Chromosoma, 2006. **115**(2): p. 110-22.
215. Gottschling, D.E., et al., *Position effect at S. cerevisiae telomeres: reversible repression of Pol II transcription*. Cell, 1990. **63**(4): p. 751-62.
216. Rine, J. and I. Herskowitz, *Four genes responsible for a position effect on expression from HML and HMR in Saccharomyces cerevisiae*. Genetics, 1987. **116**(1): p. 9-22.
217. Lu, X., et al., *The effect of H3K79 dimethylation and H4K20 trimethylation on nucleosome and chromatin structure*. Nature structural & molecular biology, 2008. **15**(10): p. 1122-4.
218. Nakayama, J., et al., *Role of histone H3 lysine 9 methylation in epigenetic control of heterochromatin assembly*. Science, 2001. **292**(5514): p. 110-3.
219. Noma, K., C.D. Allis, and S.I. Grewal, *Transitions in distinct histone H3 methylation patterns at the heterochromatin domain boundaries*. Science, 2001. **293**(5532): p. 1150-5.
220. Braunstein, M., et al., *Transcriptional silencing in yeast is associated with reduced nucleosome acetylation*. Genes & development, 1993. **7**(4): p. 592-604.
221. Gasser, S.M. and M.M. Cockell, *The molecular biology of the SIR proteins*. Gene, 2001. **279**(1): p. 1-16.
222. Rusche, L.N., A.L. Kirchmaier, and J. Rine, *The establishment, inheritance, and function of silenced chromatin in Saccharomyces cerevisiae*. Annual review of biochemistry, 2003. **72**: p. 481-516.
223. Suka, N., et al., *Highly specific antibodies determine histone acetylation site usage in yeast heterochromatin and euchromatin*. Molecular cell, 2001. **8**(2): p. 473-9.
224. Cubizolles, F., et al., *A homotrimer-heterotrimer switch in Sir2 structure differentiates rDNA and telomeric silencing*. Molecular cell, 2006. **21**(6): p. 825-36.

225. Johnson, A., et al., *Reconstitution of heterochromatin-dependent transcriptional gene silencing*. Molecular cell, 2009. **35**(6): p. 769-81.
226. Liou, G.G., et al., *Assembly of the SIR complex and its regulation by O-acetyl-ADP-ribose, a product of NAD-dependent histone deacetylation*. Cell, 2005. **121**(4): p. 515-27.
227. Martino, F., et al., *Reconstitution of yeast silent chromatin: multiple contact sites and O-AADPR binding load SIR complexes onto nucleosomes in vitro*. Molecular cell, 2009. **33**(3): p. 323-34.
228. Armache, K.J., et al., *Structural basis of silencing: Sir3 BAH domain in complex with a nucleosome at 3.0 Å resolution*. Science, 2011. **334**(6058): p. 977-82.
229. Buchberger, J.R., et al., *Sir3-nucleosome interactions in spreading of silent chromatin in *Saccharomyces cerevisiae**. Molecular and cellular biology, 2008. **28**(22): p. 6903-18.
230. Kueng, S., et al., *Regulating repression: roles for the sir4 N-terminus in linker DNA protection and stabilization of epigenetic states*. PLoS genetics, 2012. **8**(5): p. e1002727.
231. Norris, A., M.A. Blanchet, and J.D. Boeke, *Compensatory interactions between Sir3p and the nucleosomal LRS surface imply their direct interaction*. PLoS genetics, 2008. **4**(12): p. e1000301.
232. Smith, J.S., et al., *A phylogenetically conserved NAD+-dependent protein deacetylase activity in the Sir2 protein family*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2000. **97**(12): p. 6658-63.
233. Tanny, J.C., et al., *An enzymatic activity in the yeast Sir2 protein that is essential for gene silencing*. Cell, 1999. **99**(7): p. 735-45.
234. Tanny, J.C., et al., *Budding yeast silencing complexes and regulation of Sir2 activity by protein-protein interactions*. Molecular and cellular biology, 2004. **24**(16): p. 6931-46.
235. Bell, S.P., R. Kobayashi, and B. Stillman, *Yeast origin recognition complex functions in transcription silencing and DNA replication*. Science, 1993. **262**(5141): p. 1844-9.
236. Brand, A.H., et al., *Characterization of a "silencer" in yeast: a DNA sequence with properties opposite to those of a transcriptional enhancer*. Cell, 1985. **41**(1): p. 41-8.
237. Buchman, A.R., et al., *Two DNA-binding factors recognize specific sequences at silencers, upstream activating sequences, autonomously replicating sequences, and telomeres in *Saccharomyces cerevisiae**. Molecular and cellular biology, 1988. **8**(1): p. 210-25.
238. Foss, M., et al., *Origin recognition complex (ORC) in transcriptional silencing and DNA replication in *S. cerevisiae**. Science, 1993. **262**(5141): p. 1838-44.
239. Shore, D., et al., *Identification of silencer binding proteins from yeast: possible roles in SIR control and DNA replication*. EMBO journal, 1987. **6**(2): p. 461-7.
240. Moretti, P., et al., *Evidence that a complex of SIR proteins interacts with the silencer and telomere-binding protein RAP1*. Genes & development, 1994. **8**(19): p. 2257-69.

241. Luo, K., M.A. Vega-Palas, and M. Grunstein, *Rap1-Sir4 binding independent of other Sir, yKu, or histone interactions initiates the assembly of telomeric heterochromatin in yeast*. Genes & development, 2002. **16**(12): p. 1528-39.
242. Roy, R., et al., *Separation-of-function mutants of yeast Ku80 reveal a Yku80p-Sir4p interaction involved in telomeric silencing*. Journal of biological chemistry, 2004. **279**(1): p. 86-94.
243. Tsukamoto, Y., J. Kato, and H. Ikeda, *Silencing factors participate in DNA repair and recombination in *Saccharomyces cerevisiae**. Nature, 1997. **388**(6645): p. 900-3.
244. Laroche, T., et al., *Mutation of yeast Ku genes disrupts the subnuclear organization of telomeres*. Current biology, 1998. **8**(11): p. 653-6.
245. Altaf, M., et al., *Interplay of chromatin modifiers on a short basic patch of histone H4 tail defines the boundary of telomeric heterochromatin*. Molecular cell, 2007. **28**(6): p. 1002-14.
246. Fingerman, I.M., H.C. Li, and S.D. Briggs, *A charge-based interaction between histone H4 and Dot1 is required for H3K79 methylation and telomere silencing: identification of a new trans-histone pathway*. Genes & development, 2007. **21**(16): p. 2018-29.
247. Xu, F., K. Zhang, and M. Grunstein, *Acetylation in histone H3 globular domain regulates gene expression in yeast*. Cell, 2005. **121**(3): p. 375-85.
248. Bryk, M., et al., *Transcriptional silencing of Ty1 elements in the RDN1 locus of yeast*. Genes & development, 1997. **11**(2): p. 255-69.
249. Fritze, C.E., et al., *Direct evidence for SIR2 modulation of chromatin structure in yeast rDNA*. EMBO journal, 1997. **16**(21): p. 6495-509.
250. Smith, J.S. and J.D. Boeke, *An unusual form of transcriptional silencing in yeast ribosomal DNA*. Genes & development, 1997. **11**(2): p. 241-54.
251. Shou, W., et al., *Exit from mitosis is triggered by Tem1-dependent release of the protein phosphatase Cdc14 from nucleolar RENT complex*. Cell, 1999. **97**(2): p. 233-44.
252. Straight, A.F., et al., *Net1, a Sir2-associated nucleolar protein required for rDNA silencing and nucleolar integrity*. Cell, 1999. **97**(2): p. 245-56.
253. Visintin, R., E.S. Hwang, and A. Amon, *Cfi1 prevents premature exit from mitosis by anchoring Cdc14 phosphatase in the nucleolus*. Nature, 1999. **398**(6730): p. 818-23.
254. Huang, J. and D. Moazed, *Association of the RENT complex with nontranscribed and coding regions of rDNA and a regional requirement for the replication fork block protein Fob1 in rDNA silencing*. Genes & development, 2003. **17**(17): p. 2162-76.
255. Chang, C.R., et al., *Targeting of cohesin by transcriptionally silent chromatin*. Genes & development, 2005. **19**(24): p. 3031-42.
256. Kobayashi, T., et al., *SIR2 regulates recombination between different rDNA repeats, but not recombination within individual rRNA genes in yeast*. Cell, 2004. **117**(4): p. 441-53.
257. Fischer, T., et al., *Diverse roles of HP1 proteins in heterochromatin assembly and functions in fission yeast*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2009. **106**(22): p. 8998-9003.

258. Lechner, M.S., et al., *The mammalian heterochromatin protein 1 binds diverse nuclear proteins through a common motif that targets the chromoshadow domain*. Biochemical and biophysical research communications, 2005. **331**(4): p. 929-37.
259. Zeng, W., et al., *Specific loss of histone H3 lysine 9 trimethylation and HP1gamma/cohesin binding at D4Z4 repeats is associated with facioscapulohumeral dystrophy (FSHD)*. PLoS genetics, 2009. **5**(7): p. e1000559.
260. Murayama, Y. and F. Uhlmann, *Biochemical reconstitution of topological DNA binding by the cohesin ring*. Nature, 2014. **505**(7483): p. 367-71.
261. Lengronne, A., et al., *Establishment of sister chromatid cohesion at the S. cerevisiae replication fork*. Molecular cell, 2006. **23**(6): p. 787-99.
262. Lengronne, A., et al., *Cohesin relocation from sites of chromosomal loading to places of convergent transcription*. Nature, 2004. **430**(6999): p. 573-8.
263. Glynn, E.F., et al., *Genome-wide mapping of the cohesin complex in the yeast Saccharomyces cerevisiae*. PLoS biology, 2004. **2**(9): p. E259.
264. Hu, B., et al., *ATP hydrolysis is required for relocating cohesin from sites occupied by its Scc2/4 loading complex*. Current biology, 2011. **21**(1): p. 12-24.
265. Toth, A., et al., *Yeast cohesin complex requires a conserved protein, Eco1p(Ctf7), to establish cohesion between sister chromatids during DNA replication*. Genes & development, 1999. **13**(3): p. 320-33.
266. Gruber, S., et al., *Evidence that loading of cohesin onto chromosomes involves opening of its SMC hinge*. Cell, 2006. **127**(3): p. 523-37.
267. McDonald, W.H., et al., *Novel essential DNA repair proteins Nse1 and Nse2 are subunits of the fission yeast Smc5-Smc6 complex*. The Journal of biological chemistry, 2003. **278**(46): p. 45460-7.
268. Cost, G.J. and N.R. Cozzarelli, *Smc5p promotes faithful chromosome transmission and DNA repair in Saccharomyces cerevisiae*. Genetics, 2006. **172**(4): p. 2185-200.
269. Harvey, S.H., et al., *Coordination of DNA damage responses via the Smc5/Smc6 complex*. Molecular and cellular biology, 2004. **24**(2): p. 662-74.
270. Miyabe, I., et al., *Rhp51-dependent recombination intermediates that do not generate checkpoint signal are accumulated in Schizosaccharomyces pombe rad60 and smc5/6 mutants after release from replication arrest*. Molecular and cellular biology, 2006. **26**(1): p. 343-53.
271. Torres-Rosell, J., et al., *Anaphase onset before complete DNA replication with intact checkpoint responses*. Science, 2007. **315**(5817): p. 1411-5.
272. Torres-Rosell, J., et al., *The Smc5-Smc6 complex and SUMO modification of Rad52 regulates recombinational repair at the ribosomal gene locus*. Nature cell biology, 2007. **9**(8): p. 923-31.
273. Sollier, J., et al., *The Saccharomyces cerevisiae Esc2 and Smc5-6 proteins promote sister chromatid junction-mediated intra-S repair*. Molecular biology of the cell, 2009. **20**(6): p. 1671-82.
274. Branzei, D., et al., *Ubc9- and mms21-mediated sumoylation counteracts recombinogenic events at damaged replication forks*. Cell, 2006. **127**(3): p. 509-22.
275. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *Hallmarks of cancer: the next generation*. Cell, 2011. **144**(5): p. 646-74.

276. Kass, E.M. and M. Jasin, *Collaboration and competition between DNA double-strand break repair pathways*. FEBS letters, 2010. **584**(17): p. 3703-8.
277. Ira, G., et al., *DNA end resection, homologous recombination and DNA damage checkpoint activation require CDK1*. Nature, 2004. **431**(7011): p. 1011-7.
278. Zhang, Y., et al., *Regulation of repair choice: Cdk1 suppresses recruitment of end joining factors at DNA breaks*. DNA repair, 2009. **8**(10): p. 1235-41.
279. Aylon, Y., B. Liefshitz, and M. Kupiec, *The CDK regulates repair of double-strand breaks by homologous recombination during the cell cycle*. EMBO journal, 2004. **23**(24): p. 4868-75.
280. Barlow, J.H., M. Lisby, and R. Rothstein, *Differential regulation of the cellular response to DNA double-strand breaks in G1*. Molecular cell, 2008. **30**(1): p. 73-85.
281. Jazayeri, A., et al., *ATM- and cell cycle-dependent regulation of ATR in response to DNA double-strand breaks*. Nature cell biology, 2006. **8**(1): p. 37-45.
282. Stracker, T.H. and J.H. Petrini, *The MRE11 complex: starting from the ends*. Nature reviews. Molecular cell biology, 2011. **12**(2): p. 90-103.
283. D'Amours, D. and S.P. Jackson, *The Mre11 complex: at the crossroads of dna repair and checkpoint signalling*. Nature reviews. Molecular cell biology, 2002. **3**(5): p. 317-27.
284. Usui, T., H. Ogawa, and J.H. Petrini, *A DNA damage response pathway controlled by Tel1 and the Mre11 complex*. Molecular cell, 2001. **7**(6): p. 1255-66.
285. D'Amours, D. and S.P. Jackson, *The yeast Xrs2 complex functions in S phase checkpoint regulation*. Genes & development, 2001. **15**(17): p. 2238-49.
286. Baroni, E., et al., *The functions of budding yeast Sae2 in the DNA damage response require Mec1- and Tel1-dependent phosphorylation*. Molecular and cellular biology, 2004. **24**(10): p. 4151-65.
287. Clerici, M., et al., *The Saccharomyces cerevisiae Sae2 protein negatively regulates DNA damage checkpoint signalling*. EMBO reports, 2006. **7**(2): p. 212-8.
288. Finn, K., N.F. Lowndes, and M. Grenon, *Eukaryotic DNA damage checkpoint activation in response to double-strand breaks*. Cellular and molecular life sciences, 2012. **69**(9): p. 1447-73.
289. Mimitou, E.P. and L.S. Symington, *Sae2, Exo1 and Sgs1 collaborate in DNA double-strand break processing*. Nature, 2008. **455**(7214): p. 770-4.
290. Zhu, Z., et al., *Sgs1 helicase and two nucleases Dna2 and Exo1 resect DNA double-strand break ends*. Cell, 2008. **134**(6): p. 981-94.
291. Lisby, M. and R. Rothstein, *Choreography of recombination proteins during the DNA damage response*. DNA repair, 2009. **8**(9): p. 1068-76.
292. Gravel, S., et al., *DNA helicases Sgs1 and BLM promote DNA double-strand break resection*. Genes & development, 2008. **22**(20): p. 2767-72.
293. Chung, W.H., et al., *Defective resection at DNA double-strand breaks leads to de novo telomere formation and enhances gene targeting*. PLoS genetics, 2010. **6**(5): p. e1000948.
294. Sung, P., et al., *Rad51 recombinase and recombination mediators*. The Journal of biological chemistry, 2003. **278**(44): p. 42729-32.

295. Rouse, J. and S.P. Jackson, *LCD1: an essential gene involved in checkpoint control and regulation of the MEC1 signalling pathway in Saccharomyces cerevisiae*. EMBO journal, 2000. **19**(21): p. 5801-12.
296. Rouse, J. and S.P. Jackson, *Lcd1p recruits Mec1p to DNA lesions in vitro and in vivo*. Molecular cell, 2002. **9**(4): p. 857-69.
297. Zou, L. and S.J. Elledge, *Sensing DNA damage through ATRIP recognition of RPA-ssDNA complexes*. Science, 2003. **300**(5625): p. 1542-8.
298. Paciotti, V., et al., *The checkpoint protein Ddc2, functionally related to S. pombe Rad26, interacts with Mec1 and is regulated by Mec1-dependent phosphorylation in budding yeast*. Genes & development, 2000. **14**(16): p. 2046-59.
299. Majka, J., A. Niedziela-Majka, and P.M. Burgers, *The checkpoint clamp activates Mec1 kinase during initiation of the DNA damage checkpoint*. Molecular cell, 2006. **24**(6): p. 891-901.
300. Kumagai, A., et al., *TopBP1 activates the ATR-ATRIP complex*. Cell, 2006. **124**(5): p. 943-55.
301. Mordes, D.A., et al., *TopBP1 activates ATR through ATRIP and a PIKK regulatory domain*. Genes & development, 2008. **22**(11): p. 1478-89.
302. Emili, A., *MEC1-dependent phosphorylation of Rad9p in response to DNA damage*. Molecular cell, 1998. **2**(2): p. 183-9.
303. Grenon, M., et al., *Docking onto chromatin via the Saccharomyces cerevisiae Rad9 Tudor domain*. Yeast, 2007. **24**(2): p. 105-19.
304. Huyen, Y., et al., *Methylated lysine 79 of histone H3 targets 53BP1 to DNA double-strand breaks*. Nature, 2004. **432**(7015): p. 406-11.
305. Puddu, F., et al., *Phosphorylation of the budding yeast 9-1-1 complex is required for Dpb11 function in the full activation of the UV-induced DNA damage checkpoint*. Molecular and cellular biology, 2008. **28**(15): p. 4782-93.
306. Sweeney, F.D., et al., *Saccharomyces cerevisiae Rad9 acts as a Mec1 adaptor to allow Rad53 activation*. Current biology, 2005. **15**(15): p. 1364-75.
307. Usui, T., S.S. Foster, and J.H. Petrini, *Maintenance of the DNA-damage checkpoint requires DNA-damage-induced mediator protein oligomerization*. Molecular cell, 2009. **33**(2): p. 147-59.
308. Kantake, N., et al., *The recombination-deficient mutant RPA (rfa1-t11) is displaced slowly from single-stranded DNA by Rad51 protein*. The Journal of biological chemistry, 2003. **278**(26): p. 23410-7.
309. Seong, C., et al., *Molecular anatomy of the recombination mediator function of Saccharomyces cerevisiae Rad52*. The Journal of biological chemistry, 2008. **283**(18): p. 12166-74.
310. Shinohara, A., H. Ogawa, and T. Ogawa, *Rad51 protein involved in repair and recombination in S. cerevisiae is a RecA-like protein*. Cell, 1992. **69**(3): p. 457-70.
311. Krejci, L., et al., *Interaction with Rad51 is indispensable for recombination mediator function of Rad52*. The Journal of biological chemistry, 2002. **277**(42): p. 40132-41.
312. Shinohara, A. and T. Ogawa, *Stimulation by Rad52 of yeast Rad51-mediated recombination*. Nature, 1998. **391**(6665): p. 404-7.

313. Krejci, L., et al., *Homologous recombination and its regulation*. Nucleic acids research, 2012. **40**(13): p. 5795-818.
314. Podust, V.N., et al., *Replication factor C disengages from proliferating cell nuclear antigen (PCNA) upon sliding clamp formation, and PCNA itself tethers DNA polymerase delta to DNA*. The Journal of biological chemistry, 1998. **273**(48): p. 31992-9.
315. Tsurimoto, T. and B. Stillman, *Replication factors required for SV40 DNA replication in vitro. I. DNA structure-specific recognition of a primer-template junction by eukaryotic DNA polymerases and their accessory proteins*. The Journal of biological chemistry, 1991. **266**(3): p. 1950-60.
316. Tsurimoto, T. and B. Stillman, *Functions of replication factor C and proliferating-cell nuclear antigen: functional similarity of DNA polymerase accessory proteins from human cells and bacteriophage T4*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1990. **87**(3): p. 1023-7.
317. Cai, J., et al., *Reconstitution of human replication factor C from its five subunits in baculovirus-infected insect cells*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1996. **93**(23): p. 12896-901.
318. Li, X., et al., *PCNA is required for initiation of recombination-associated DNA synthesis by DNA polymerase delta*. Molecular cell, 2009. **36**(4): p. 704-13.
319. Wang, X., et al., *Role of DNA replication proteins in double-strand break-induced recombination in *Saccharomyces cerevisiae**. Molecular and cellular biology, 2004. **24**(16): p. 6891-9.
320. Yuzhakov, A., et al., *Multiple competition reactions for RPA order the assembly of the DNA polymerase delta holoenzyme*. EMBO journal, 1999. **18**(21): p. 6189-99.
321. Waga, S. and B. Stillman, *Cyclin-dependent kinase inhibitor p21 modulates the DNA primer-template recognition complex*. Molecular and cellular biology, 1998. **18**(7): p. 4177-87.
322. Hicks, W.M., M. Kim, and J.E. Haber, *Increased mutagenesis and unique mutation signature associated with mitotic gene conversion*. Science, 2010. **329**(5987): p. 82-5.
323. Maloisel, L., F. Fabre, and S. Gangloff, *DNA polymerase delta is preferentially recruited during homologous recombination to promote heteroduplex DNA extension*. Molecular and cellular biology, 2008. **28**(4): p. 1373-82.
324. Ruiz, J.F., B. Gomez-Gonzalez, and A. Aguilera, *Chromosomal translocations caused by either pol32-dependent or pol32-independent triparental break-induced replication*. Molecular and cellular biology, 2009. **29**(20): p. 5441-54.
325. Sebesta, M., et al., *Reconstitution of DNA repair synthesis in vitro and the role of polymerase and helicase activities*. DNA repair, 2011. **10**(6): p. 567-76.
326. Nassif, N., et al., *Efficient copying of nonhomologous sequences from ectopic sites via P-element-induced gap repair*. Molecular and cellular biology, 1994. **14**(3): p. 1613-25.
327. Ira, G., et al., *Srs2 and Sgs1-Top3 suppress crossovers during double-strand break repair in yeast*. Cell, 2003. **115**(4): p. 401-11.

328. Mitchel, K., K. Lehner, and S. Jinks-Robertson, *Heteroduplex DNA position defines the roles of the Sgs1, Srs2, and Mph1 helicases in promoting distinct recombination outcomes*. PLoS genetics, 2013. **9**(3): p. e1003340.
329. Paliwal, S., et al., *Human RECQL helicase promotes repair of DNA double-strand breaks by synthesis-dependent strand annealing*. Nucleic acids research, 2013.
330. Malkova, A., E.L. Ivanov, and J.E. Haber, *Double-strand break repair in the absence of RAD51 in yeast: a possible role for break-induced DNA replication*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1996. **93**(14): p. 7131-6.
331. Bocquet, N., et al., *Structural and mechanistic insight into Holliday-junction dissolution by Topoisomerase IIIalpha and RMI1*. Nature structural & molecular biology, 2014.
332. Wu, L., et al., *BLAP75/RMI1 promotes the BLM-dependent dissolution of homologous recombination intermediates*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2006. **103**(11): p. 4068-73.
333. Xue, X., et al., *Role of replication protein A in double holliday junction dissolution mediated by the BLM-Topo IIIalpha-RMI1-RMI2 protein complex*. The Journal of biological chemistry, 2013. **288**(20): p. 14221-7.
334. Plank, J.L., J. Wu, and T.S. Hsieh, *Topoisomerase IIIalpha and Bloom's helicase can resolve a mobile double Holliday junction substrate through convergent branch migration*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2006. **103**(30): p. 11118-23.
335. Cejka, P., et al., *Rmi1 stimulates decatenation of double Holliday junctions during dissolution by Sgs1-Top3*. Nature structural & molecular biology, 2010. **17**(11): p. 1377-82.
336. Chen, X.B., et al., *Human Mus81-associated endonuclease cleaves Holliday junctions in vitro*. Molecular cell, 2001. **8**(5): p. 1117-27.
337. Ciccia, A., A. Constantinou, and S.C. West, *Identification and characterization of the human mus81-eme1 endonuclease*. The Journal of biological chemistry, 2003. **278**(27): p. 25172-8.
338. Andersen, S.L., et al., *Drosophila MUS312 and the vertebrate ortholog BTBD12 interact with DNA structure-specific endonucleases in DNA repair and recombination*. Molecular cell, 2009. **35**(1): p. 128-35.
339. Fekairi, S., et al., *Human SLX4 is a Holliday junction resolvase subunit that binds multiple DNA repair/recombination endonucleases*. Cell, 2009. **138**(1): p. 78-89.
340. Ip, S.C., et al., *Identification of Holliday junction resolvases from humans and yeast*. Nature, 2008. **456**(7220): p. 357-61.
341. Matos, J., et al., *Regulatory control of the resolution of DNA recombination intermediates during meiosis and mitosis*. Cell, 2011. **147**(1): p. 158-72.
342. Fabre, F., et al., *Alternate pathways involving Sgs1/Top3, Mus81/ Mms4, and Srs2 prevent formation of toxic recombination intermediates from single-stranded gaps created by DNA replication*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2002. **99**(26): p. 16887-92.

343. Munoz-Galvan, S., et al., *Distinct roles of Mus81, Yen1, Slx1-Slx4, and Rad1 nucleases in the repair of replication-born double-strand breaks by sister chromatid exchange*. Molecular and cellular biology, 2012. **32**(9): p. 1592-603.
344. De Piccoli, G., et al., *Smc5-Smc6 mediate DNA double-strand-break repair by promoting sister-chromatid recombination*. Nature cell biology, 2006. **8**(9): p. 1032-4.
345. Stephan, A.K., et al., *Roles of vertebrate Smc5 in sister chromatid cohesion and homologous recombinational repair*. Molecular and cellular biology, 2011. **31**(7): p. 1369-81.
346. Watanabe, Y., *The importance of being Smc5/6*. Nature cell biology, 2005. **7**(4): p. 329-31.
347. Cortes-Ledesma, F. and A. Aguilera, *Double-strand breaks arising by replication through a nick are repaired by cohesin-dependent sister-chromatid exchange*. EMBO reports, 2006. **7**(9): p. 919-26.
348. Kim, J.S., et al., *Specific recruitment of human cohesin to laser-induced DNA damage*. The Journal of biological chemistry, 2002. **277**(47): p. 45149-53.
349. Strom, L., et al., *Postreplicative formation of cohesion is required for repair and induced by a single DNA break*. Science, 2007. **317**(5835): p. 242-5.
350. Strom, L., et al., *Postreplicative recruitment of cohesin to double-strand breaks is required for DNA repair*. Molecular cell, 2004. **16**(6): p. 1003-15.
351. Unal, E., et al., *DNA damage response pathway uses histone modification to assemble a double-strand break-specific cohesin domain*. Molecular cell, 2004. **16**(6): p. 991-1002.
352. Unal, E., J.M. Heidinger-Pauli, and D. Koshland, *DNA double-strand breaks trigger genome-wide sister-chromatid cohesion through Eco1 (Ctf7)*. Science, 2007. **317**(5835): p. 245-8.
353. Fritsch, O., et al., *DNA ligase 4 stabilizes the ribosomal DNA array upon fork collapse at the replication fork barrier*. DNA repair, 2010. **9**(8): p. 879-88.
354. Hoege, C., et al., *RAD6-dependent DNA repair is linked to modification of PCNA by ubiquitin and SUMO*. Nature, 2002. **419**(6903): p. 135-41.
355. Haracska, L., et al., *Ubiquitylation of yeast proliferating cell nuclear antigen and its implications for translesion DNA synthesis*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2006. **103**(17): p. 6477-82.
356. Gangavarapu, V., S. Prakash, and L. Prakash, *Requirement of RAD52 group genes for postreplication repair of UV-damaged DNA in *Saccharomyces cerevisiae**. Molecular and cellular biology, 2007. **27**(21): p. 7758-64.
357. Arnaudeau, C., C. Lundin, and T. Helleday, *DNA double-strand breaks associated with replication forks are predominantly repaired by homologous recombination involving an exchange mechanism in mammalian cells*. Journal of molecular biology, 2001. **307**(5): p. 1235-45.
358. Kegel, A. and C. Sjogren, *The Smc5/6 complex: more than repair?* Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology, 2010. **75**: p. 179-87.
359. Irmisch, A., et al., *Smc5/6 maintains stalled replication forks in a recombination-competent conformation*. EMBO journal, 2009. **28**(2): p. 144-55.

360. Bermudez-Lopez, M., et al., *The Smc5/6 complex is required for dissolution of DNA-mediated sister chromatid linkages*. Nucleic acids research, 2010. **38**(19): p. 6502-12.
361. Chavez, A., et al., *Sumoylation and the structural maintenance of chromosomes (Smc) 5/6 complex slow senescence through recombination intermediate resolution*. The Journal of biological chemistry, 2010. **285**(16): p. 11922-30.
362. Benard, M., C. Maric, and G. Pierron, *DNA replication-dependent formation of joint DNA molecules in Physarum polycephalum*. Molecular cell, 2001. **7**(5): p. 971-80.
363. Lopes, M., et al., *Branch migrating sister chromatid junctions form at replication origins through Rad51/Rad52-independent mechanisms*. Molecular cell, 2003. **12**(6): p. 1499-510.
364. Segurado, M., M. Gomez, and F. Antequera, *Increased recombination intermediates and homologous integration hot spots at DNA replication origins*. Molecular cell, 2002. **10**(4): p. 907-16.
365. Liberi, G., et al., *Rad51-dependent DNA structures accumulate at damaged replication forks in sgs1 mutants defective in the yeast ortholog of BLM RecQ helicase*. Genes & development, 2005. **19**(3): p. 339-50.
366. Chen, Y.H., et al., *Interplay between the Smc5/6 complex and the Mph1 helicase in recombinational repair*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2009. **106**(50): p. 21252-7.
367. Choi, K., et al., *The Smc5/6 complex and Esc2 influence multiple replication-associated recombination processes in Saccharomyces cerevisiae*. Molecular biology of the cell, 2010. **21**(13): p. 2306-14.
368. Whitby, M.C., *The FANCM family of DNA helicases/translocases*. DNA repair, 2010. **9**(3): p. 224-36.
369. Xue, X., et al., *Restriction of replication fork regression activities by a conserved SMC complex*. Molecular cell, 2014. **56**(3): p. 436-45.
370. Tsang, E. and A.M. Carr, *Replication fork arrest, recombination and the maintenance of ribosomal DNA stability*. DNA repair, 2008. **7**(10): p. 1613-23.
371. Henderson, A.S., D. Warburton, and K.C. Atwood, *Location of ribosomal DNA in the human chromosome complement*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1972. **69**(11): p. 3394-8.
372. Huang, G.S. and R.L. Keil, *Requirements for activity of the yeast mitotic recombination hotspot HOT1: RNA polymerase I and multiple cis-acting sequences*. Genetics, 1995. **141**(3): p. 845-55.
373. Voelkel-Meiman, K., R.L. Keil, and G.S. Roeder, *Recombination-stimulating sequences in yeast ribosomal DNA correspond to sequences regulating transcription by RNA polymerase I*. Cell, 1987. **48**(6): p. 1071-9.
374. Brewer, B.J. and W.L. Fangman, *A replication fork barrier at the 3' end of yeast ribosomal RNA genes*. Cell, 1988. **55**(4): p. 637-43.
375. Linskens, M.H. and J.A. Huberman, *Organization of replication of ribosomal DNA in Saccharomyces cerevisiae*. Molecular and cellular biology, 1988. **8**(11): p. 4927-35.
376. Mohanty, B.K. and D. Bastia, *Binding of the replication terminator protein Fob1p to the Ter sites of yeast causes polar fork arrest*. The Journal of biological chemistry, 2004. **279**(3): p. 1932-41.

377. Kobayashi, T., *The replication fork barrier site forms a unique structure with Fob1p and inhibits the replication fork*. Molecular and cellular biology, 2003. **23**(24): p. 9178-88.
378. Brewer, B.J., D. Lockshon, and W.L. Fangman, *The arrest of replication forks in the rDNA of yeast occurs independently of transcription*. Cell, 1992. **71**(2): p. 267-76.
379. Kobayashi, T., et al., *Identification of a site required for DNA replication fork blocking activity in the rRNA gene cluster in *Saccharomyces cerevisiae**. Molecular & general genetics, 1992. **233**(3): p. 355-62.
380. Takeuchi, Y., T. Horiuchi, and T. Kobayashi, *Transcription-dependent recombination and the role of fork collision in yeast rDNA*. Genes & development, 2003. **17**(12): p. 1497-506.
381. Sanchez, J.A., S.M. Kim, and J.A. Huberman, *Ribosomal DNA replication in the fission yeast, *Schizosaccharomyces pombe**. Experimental cell research, 1998. **238**(1): p. 220-30.
382. Ward, T.R., et al., *Ribosomal DNA replication fork barrier and HOT1 recombination hot spot: shared sequences but independent activities*. Molecular and cellular biology, 2000. **20**(13): p. 4948-57.
383. Lopez-estrano, C., et al., *Co-localization of polar replication fork barriers and rRNA transcription terminators in mouse rDNA*. Journal of molecular biology, 1998. **277**(2): p. 249-56.
384. Little, R.D., T.H. Platt, and C.L. Schildkraut, *Initiation and termination of DNA replication in human rRNA genes*. Molecular and cellular biology, 1993. **13**(10): p. 6600-13.
385. Johzuka, K. and T. Horiuchi, *Replication fork block protein, Fob1, acts as an rDNA region specific recombinator in *S. cerevisiae**. Genes Cells, 2002. **7**(2): p. 99-113.
386. Kobayashi, T., et al., *Expansion and contraction of ribosomal DNA repeats in *Saccharomyces cerevisiae*: requirement of replication fork blocking (Fob1) protein and the role of RNA polymerase I*. Genes & development, 1998. **12**(24): p. 3821-30.
387. Merker, R.J. and H.L. Klein, *hpr1Delta affects ribosomal DNA recombination and cell life span in *Saccharomyces cerevisiae**. Molecular and cellular biology, 2002. **22**(2): p. 421-9.
388. Calzada, A., et al., *Molecular anatomy and regulation of a stable replisome at a paused eukaryotic DNA replication fork*. Genes & development, 2005. **19**(16): p. 1905-19.
389. Lambert, S., et al., *Gross chromosomal rearrangements and elevated recombination at an inducible site-specific replication fork barrier*. Cell, 2005. **121**(5): p. 689-702.
390. Gruber, M., R.E. Wellinger, and J.M. Sogo, *Architecture of the replication fork stalled at the 3' end of yeast ribosomal genes*. Molecular and cellular biology, 2000. **20**(15): p. 5777-87.
391. Lucchini, R. and J.M. Sogo, *Chromatin structure and transcriptional activity around the replication forks arrested at the 3' end of the yeast rRNA genes*. Molecular and cellular biology, 1994. **14**(1): p. 318-26.
392. Dalgaard, J.Z. and A.J. Klar, *swi1 and swi3 perform imprinting, pausing, and termination of DNA replication in *S. pombe**. Cell, 2000. **102**(6): p. 745-51.

393. Krings, G. and D. Bastia, *swi1- and swi3-dependent and independent replication fork arrest at the ribosomal DNA of Schizosaccharomyces pombe*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2004. **101**(39): p. 14085-90.
394. Mohanty, B.K., N.K. Bairwa, and D. Bastia, *The Tof1p-Csm3p protein complex counteracts the Rrm3p helicase to control replication termination of Saccharomyces cerevisiae*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2006. **103**(4): p. 897-902.
395. Tourriere, H., et al., *Mrc1 and Tof1 promote replication fork progression and recovery independently of Rad53*. Molecular cell, 2005. **19**(5): p. 699-706.
396. Gambus, A., et al., *GINS maintains association of Cdc45 with MCM in replisome progression complexes at eukaryotic DNA replication forks*. Nature cell biology, 2006. **8**(4): p. 358-66.
397. Lee, B.S., S.I. Grewal, and A.J. Klar, *Biochemical interactions between proteins and mat1 cis-acting sequences required for imprinting in fission yeast*. Molecular and cellular biology, 2004. **24**(22): p. 9813-22.
398. Noguchi, E., et al., *Swi1 and Swi3 are components of a replication fork protection complex in fission yeast*. Molecular and cellular biology, 2004. **24**(19): p. 8342-55.
399. Katou, Y., et al., *S-phase checkpoint proteins Tof1 and Mrc1 form a stable replication-pausing complex*. Nature, 2003. **424**(6952): p. 1078-83.
400. Mayer, M.L., et al., *Identification of protein complexes required for efficient sister chromatid cohesion*. Molecular biology of the cell, 2004. **15**(4): p. 1736-45.
401. Torres-Rosell, J., F. Machin, and L. Aragon, *Smc5-Smc6 complex preserves nucleolar integrity in S. cerevisiae*. Cell cycle, 2005. **4**(7): p. 868-72.
402. Chiolo, I., et al., *Double-strand breaks in heterochromatin move outside of a dynamic HP1a domain to complete recombinational repair*. Cell, 2011. **144**(5): p. 732-44.
403. Blackburn, E.H., *Switching and signaling at the telomere*. Cell, 2001. **106**(6): p. 661-73.
404. Harley, C.B., A.B. Futcher, and C.W. Greider, *Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts*. Nature, 1990. **345**(6274): p. 458-60.
405. Bodnar, A.G., et al., *Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells*. Science, 1998. **279**(5349): p. 349-52.
406. Shay, J.W. and S. Bacchetti, *A survey of telomerase activity in human cancer*. European journal of cancer, 1997. **33**(5): p. 787-91.
407. Muntoni, A. and R.R. Reddel, *The first molecular details of ALT in human tumor cells*. Human molecular genetics, 2005. **14 Spec No. 2**: p. R191-6.
408. Dunham, M.A., et al., *Telomere maintenance by recombination in human cells*. Nature genetics, 2000. **26**(4): p. 447-50.
409. Yeager, T.R., et al., *Telomerase-negative immortalized human cells contain a novel type of promyelocytic leukemia (PML) body*. Cancer research, 1999. **59**(17): p. 4175-9.
410. Lin, D.Y., et al., *Role of SUMO-interacting motif in Daxx SUMO modification, subnuclear localization, and repression of sumoylated transcription factors*. Molecular cell, 2006. **24**(3): p. 341-54.

411. Cuylen, S., J. Metz, and C.H. Haering, *Condensin structures chromosomal DNA through topological links*. Nature structural & molecular biology, 2011. **18**(8): p. 894-901.
412. Ivanov, D. and K. Nasmyth, *A topological interaction between cohesin rings and a circular minichromosome*. Cell, 2005. **122**(6): p. 849-60.
413. Akai, Y., et al., *Opposing role of condensin hinge against replication protein A in mitosis and interphase through promoting DNA annealing*. Open biology, 2011. **1**(4): p. 110023.
414. Bochkarev, A., et al., *Structure of the single-stranded-DNA-binding domain of replication protein A bound to DNA*. Nature, 1997. **385**(6612): p. 176-81.
415. Brill, S.J. and S. Bastin-Shanower, *Identification and characterization of the fourth single-stranded-DNA binding domain of replication protein A*. Molecular and cellular biology, 1998. **18**(12): p. 7225-34.
416. Blackwell, L.J., J.A. Borowiec, and I.A. Mastrangelo, *Single-stranded-DNA binding alters human replication protein A structure and facilitates interaction with DNA-dependent protein kinase*. Molecular and cellular biology, 1996. **16**(9): p. 4798-807.
417. Brogaard, K., et al., *A map of nucleosome positions in yeast at base-pair resolution*. Nature, 2012. **486**(7404): p. 496-501.
418. Sogo, J.M., M. Lopes, and M. Foiani, *Fork reversal and ssDNA accumulation at stalled replication forks owing to checkpoint defects*. Science, 2002. **297**(5581): p. 599-602.
419. Huertas, P., *DNA resection in eukaryotes: deciding how to fix the break*. Nature structural & molecular biology, 2010. **17**(1): p. 11-6.
420. Taylor, I.C., et al., *Facilitated binding of GAL4 and heat shock factor to nucleosomal templates: differential function of DNA-binding domains*. Genes & development, 1991. **5**(7): p. 1285-98.
421. Broderick, S., et al., *Eukaryotic single-stranded DNA binding proteins: central factors in genome stability*. Sub-cellular biochemistry, 2010. **50**: p. 143-63.
422. Wold, M.S., *Replication protein A: a heterotrimeric, single-stranded DNA-binding protein required for eukaryotic DNA metabolism*. Annual review of biochemistry, 1997. **66**: p. 61-92.
423. Benson, F.E., P. Baumann, and S.C. West, *Synergistic actions of Rad51 and Rad52 in recombination and DNA repair*. Nature, 1998. **391**(6665): p. 401-4.
424. New, J.H., et al., *Rad52 protein stimulates DNA strand exchange by Rad51 and replication protein A*. Nature, 1998. **391**(6665): p. 407-10.
425. Sung, P., *Function of yeast Rad52 protein as a mediator between replication protein A and the Rad51 recombinase*. The Journal of biological chemistry, 1997. **272**(45): p. 28194-7.
426. Mer, G., et al., *Structural basis for the recognition of DNA repair proteins UNG2, XPA, and RAD52 by replication factor RPA*. Cell, 2000. **103**(3): p. 449-56.
427. Sugiyama, T. and S.C. Kowalczykowski, *Rad52 protein associates with replication protein A (RPA)-single-stranded DNA to accelerate Rad51-mediated displacement of RPA and presynaptic complex formation*. The Journal of biological chemistry, 2002. **277**(35): p. 31663-72.

428. Xu, X., et al., *The basic cleft of RPA70N binds multiple checkpoint proteins, including RAD9, to regulate ATR signaling*. Molecular and cellular biology, 2008. **28**(24): p. 7345-53.
429. Chen, C., K. Umezu, and R.D. Kolodner, *Chromosomal rearrangements occur in S. cerevisiae rfa1 mutator mutants due to mutagenic lesions processed by double-strand-break repair*. Molecular cell, 1998. **2**(1): p. 9-22.
430. Soustelle, C., et al., *Replication protein A is required for meiotic recombination in Saccharomyces cerevisiae*. Genetics, 2002. **161**(2): p. 535-47.
431. Umezu, K., et al., *Genetic analysis of yeast RPA1 reveals its multiple functions in DNA metabolism*. Genetics, 1998. **148**(3): p. 989-1005.
432. Alani, E., et al., *Characterization of DNA-binding and strand-exchange stimulation properties of γ -RPA, a yeast single-strand-DNA-binding protein*. Journal of molecular biology, 1992. **227**(1): p. 54-71.
433. Takahashi, T.S., et al., *Cdc7-Drf1 kinase links chromosome cohesion to the initiation of DNA replication in Xenopus egg extracts*. Genes & development, 2008. **22**(14): p. 1894-905.
434. Leung, G.P., et al., *Rtt107 is required for recruitment of the SMC5/6 complex to DNA double strand breaks*. The Journal of biological chemistry, 2011. **286**(29): p. 26250-7.
435. Bermudez, V.P., et al., *In vitro loading of human cohesin on DNA by the human Scc2-Scc4 loader complex*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2012. **109**(24): p. 9366-71.

7.0) Curriculum vitae

Marc-André Roy, M.Sc.

PROFIL SCOLAIRE

Doctorat en Biologie Moléculaire

Obtention prévue : 2015

Université de Montréal

Directeur de thèse : Damien D'Amours

Sujet : Caractérisation biochimique du complexe Smc5-6

Maîtrise en Biologie Moléculaire

Obtention : mai 2009

Université de Montréal

Directeur de mémoire : Damien D'Amours

Sujet : Caractérisation biochimique du complexe Smc5-6

Baccalauréat en Pharmacologie

Obtention : mai 2008

Université de Sherbrooke

COMPÉTENCES PARTICULIÈRES

Linguistique : Français : 5/5 Anglais : 4.5/5

Qualités personnelles : sens des responsabilités, autonomie, motivation, esprit de synthèse, bonne communication et excellente capacité de vulgarisation scientifique

EXPÉRIENCE DE TRAVAIL

Stagiaire Institut de Pharmacologie de Sherbrooke (IPS)

Été 2007

- Vérifier l'interaction entre la LDL receptor-related protein 9 et la matriptase
- Sous la supervision du Dre Christine Lavoie et du Dr Richard Leduc

Stagiaire Faculté de Médecine de Sherbrooke

Été 2006

- Dosage de l'oxygène et du dioxyde de carbone dans du perfluorocarbone
- Sous la supervision du Dr Hervé Walti

Moniteur OTJ Ville de Sherbrooke

Été 2004 - Été 2005

- Planifier et animer les activités des enfants pour un camp de jour
- Gérer les situations conflictuelles entre enfants ainsi qu'avec leurs parents

PUBLICATIONS

Guillaume Laflamme, Thierry Tremblay-Boudreault, **Marc-André Roy**, 2014
Parker Andersen, Éric Bonneil, Kaleem Atchia, Pierre Thibault, Damien D'Amours et
Benjamin H. Kwok
Structural Maintenance of Chromosome (SMC) proteins link microtubule stability
to genome integrity. Journal of Biological Chemistry 289(40), 27418-27431

Marc-André Roy et Damien D'Amours 2011
DNA-binding properties of Smc6, a core component of the Smc5-6 DNA
repair complex. Biochemical and Biophysical Research Communications 416(1-2),80-5

Marc-André Roy, Nadeem Siddiqui et Damien D'Amours 2011
Dynamic and selective DNA-binding activity of Smc5, a core component
of the Smc5-Smc6 complex. Cell Cycle 10, 690-700

BOURSES ET PRIX

Bourse de Doctorat FRSQ	2012-2014
Bourse de Doctorat des Programmes en Biologie Moléculaire	2011-2012
	2010-2011
	2009-2010
Bourse du FRSQ pour un stage en milieu universitaire	Été 2007
Bourse de la Faculté de Médecine de Sherbrooke	Été 2006
Prix d'excellence IRIC pour la qualité d'une présentation	2010
Prix d'excellence Glaxo Smith Kline pour la qualité d'une présentation	2010

