

Université de Montréal

**Étude du rôle de la phosphorylation du complexe Mre11-
Rad50-Xrs2 dans le maintien de l'intégrité génomique**

par

Antoine Simoneau

Programmes de biologie moléculaire

Faculté de médecine

Mémoire présenté à la Faculté de Médecine
en vue de l'obtention du grade de Maîtrise
en biologie moléculaire

Novembre. 2012

© Antoine Simoneau, 2012

Résumé

L'ADN de chaque cellule est constamment soumis à des stress pouvant compromettre son intégrité. Les bris double-brins sont probablement les dommages les plus nocifs pour la cellule et peuvent être des sources de réarrangements chromosomiques majeurs et mener au cancer s'ils sont mal réparés. La recombinaison homologe et la jonction d'extrémités non-homologues (JENH) sont deux voies fondamentalement différentes utilisées pour réparer ce type de dommage. Or, les mécanismes régulant le choix entre ces deux voies pour la réparation des bris double-brins demeurent nébuleux. Le complexe Mre11-Rad50-Xrs2 (MRX) est le premier acteur à être recruté à ce type de bris où il contribue à la réparation par recombinaison homologe ou JENH. À l'intersection de ces deux voies, il est donc idéalement placé pour orienter le choix de réparation. Ce mémoire met en lumière deux systèmes distincts de phosphorylation du complexe MRX régulant spécifiquement le JENH. L'un dépend de la progression du cycle cellulaire et inhibe le JENH, tandis que l'autre requiert la présence de dommages à l'ADN et est nécessaire au JENH. Ensembles, nos résultats suggèrent que le complexe MRX intègre différents phospho-stimuli pour réguler le choix de la voie de réparation.

Mots-clés : Complexe Mre11-Rad50-Xrs2, bris double-brins, cycle cellulaire, réponse aux dommages à l'ADN, points de contrôle des dommages à l'ADN, recombinaison homologe, JENH, syndrome de Nimègue, Tel1/ATM, résection, CDK

Abstract

The genome of every cell is constantly subjected to stresses that could compromise its integrity. DNA double-strand breaks (DSB) are amongst the most damaging events for a cell and can lead to gross chromosomal rearrangements, cell death and cancer if improperly repaired. Homologous recombination and non-homologous end joining (NHEJ) are the main repair pathways responsible for the repair of DSBs. However, the mechanistic basis of both pathways is fundamentally different and the regulation of the choice between both for the repair of DSBs remains largely misunderstood. The Mre11-Rad50-Xrs2 (MRX) complex acts as a DSB first responder and contributes to repair by both homologous recombination and NHEJ. Being at the crossroads of both DSB repair pathways, the MRX complex is therefore in a convenient position to influence the repair choice. This thesis unravels two distinct phosphorylation systems modifying the MRX complex and specifically regulating repair by NHEJ. The first relies on cell cycle progression and inhibits NHEJ, while the second requires the presence of DNA damage and is necessary for efficient NHEJ. Together, our results suggest a model in which the MRX complex would act as an integrator of phospho-stimuli in order to regulate the DSB repair pathway choice.

Keywords : Mre11-Rad50-Xrs2 complex, double-strand break, cell cycle, DNA damage response, DNA damage checkpoints, homologous recombination, NHEJ, Nijmegen breakage syndrome, Tel1/ATM, resection, CDK

Table des matières

Résumé.....	ii
Abstract.....	iii
Table des matières.....	iv
Liste des tableaux.....	vi
Liste des figures.....	vii
Liste des sigles et abréviations.....	viii
Remerciements.....	ix
Introduction.....	ix
L'importance de la stabilité génomique.....	1
Le complexe MRX.....	2
Mre11.....	3
Rad50.....	3
Xrs2.....	5
Le complexe MRX, une unité structurelle.....	6
Une machine adaptable et multifonctionnelle.....	7
Les bris double-brins "naturels".....	7
Les processus de réparation des bris double-brins.....	10
Les points de contrôle des dommages à l'ADN.....	10
La recombinaison homologue.....	12
La jonction d'extrémités non-homologues.....	16
L'intégration des multiples fonctions du complexe MRX au cours du cycle cellulaire.....	19
Bras de fer entre la recombinaison homologue et le JENH.....	19
Cdc28 coordonne le maintien de l'intégrité génomique.....	20
Le complexe MRX, déterminant des voies de réparation?.....	22
Contribution de l'étudiant.....	23
Phosphorylation-dependent regulation of the Mre11 complex influences the DNA repair pathway preference in mitosis.....	24
ABSTRACT.....	25

INTRODUCTION	26
RESULTS	28
DNA damage-independent phosphorylation of Xrs2 during the cell cycle	28
Cdk1 is an MRX kinase	30
The DNA damage- and cell cycle-specific phosphorylation of MRX are independent events	37
DSB resection and HR are not defective in phospho-deficient mutants of the MRX complex	43
Xrs2 and Mre11 phosphorylation regulates DSB repair by NHEJ	46
DISCUSSION	50
MATERIALS AND METHODS	53
Yeast manipulations and growth conditions	53
Mutant generation	54
Protein purification	54
<i>In vitro</i> phosphorylation and dephosphorylation of Xrs2 and Mre11	54
Protein samples and SDS-PAGE	55
DNA damage response phenotypic analysis	55
DSB resection assays	55
NHEJ efficiency	56
Telomere length analysis	56
I-Ppo viability	56
ACKNOWLEDGMENTS	60
Conclusion	61
La phosphorylation du complexe MRX au cours du cycle cellulaire	61
La phosphorylation du complexe MRX en réponse aux dommages à l'ADN	67
Le complexe MRX, au centre du choix de la voie de réparation des bris double-brins	69
Un système évolutivement conservé	72
Bibliographie	75

Liste des tableaux

TABLE I. List of strains	56
--------------------------------	----

Liste des figures

Figure 1. Les composants et la structure proposée du complexe.....	4
Figure 2. Conformations adoptées par le complexe MRX	8
Figure 3. Schéma explicatif du processus de recombinaison homologue.....	13
Figure 4. Modèle du mécanisme moléculaire de la phosphorylation du complexe MRX par Cdk.....	64
Figure 5. Mécanisme proposé de la dissociation du complexe Ku70/Ku80 en phase G2/M du cycle cellulaire	65
Figure 6. Modèle du repliement intramoléculaire de Xrs2.....	66
Figure 7. Augmentation de la concentration effective des facteurs de JENH par l'hyperphosphorylation du complexe MRX.....	68
Figure 8. Modèle du rôle de la phosphorylation du complexe MRX dans les choix des voies de réparation	72

Figures de l'article

Figure 1. Phosphorylation of Xrs2 occurs in G2/M.....	29
Figure 2. Xrs2 is phosphorylated by Cdc28 in vivo and in vitro	32
Figure 3. Mre11 is a substrate for phosphorylation by Cdc28.....	35
Figure S1. Cdc28 phosphorylation events on Mre11 and Xrs2 are independent.....	38
Figure S2. Mass spectrometry analysis of DNA damage induced phosphorylation of Xrs2	40
Figure 4. DNA damage-dependent phosphorylation of Xrs2 and Mre11 mutants	41
Figure 5. Cdc28 phosphorylation of the MRX complex is not required for HR.....	44
Figure S3. Analysis of Cdc28-dependent MRX complex phosphorylation in HR	45
Figure 6. Roles of Cdk1- and DNA damage-dependent phosphorylation of the MRX complex	48

Liste des sigles et abréviations

ABC	Adenosine tri-phosphate-binding cassette
AT	Ataxia telangiectasia
ATLD	Ataxia telangiectasia-like disease
BRCT	Breast cancer carboxy-terminal
C	Cystéine
C-terminal	Carboxy-terminal
CDK	Cyclin-dependent kinase
CHIP	Cohistoimmunoprécipitation
DNA-PK	DNA-dependent protein kinase
FHA	Fork-head-associated
Gln	Glutamine
MAP	Mitogen-activated protein (kinase)
MRN	MRE11-RAD50-NBS1
MRX	Mre11-Rad50-Xrs2
NBS	Syndrome de Nijmegen
NHEJ	Non-homologous end-joining
N-terminal	Amino-terminal
JENH	Jonction d'extrémités non-homologues
<i>P. furiosus</i>	<i>Pyrococcus furiosus</i>
Pro	Proline
RSS	Recombination signal sequence
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Ser	Sérine
TdT	Terminal deoxytidyl transferase
Thr	Thréonine
UV	Ultraviolet
V(D)J	Variable diverse joining
X	Acide aminé aléatoire

Remerciements

Je tiens à remercier tous ceux qui m'ont aidé de près ou de loin tout au long de ma maîtrise, notamment Anne-Marie Ladouceur pour m'avoir initié à ce projet, Franck Bazile pour m'avoir considérablement aidé par ses idées et conseils, Xavier Robellet et Hery Ratsima pour leurs idées et leur aide pour la rédaction de ce mémoire, Marc-André Roy pour ses conseils technique et aussi Mirela Pascariu sans qui mon projet aurait été beaucoup plus difficile. Je tiens aussi à remercier mon superviseur, Damien D'Amours, pour m'avoir accueilli dans son laboratoire et pour m'avoir supporté tout au long de ma maîtrise. Merci aussi à tous les membres des laboratoires des Dr. Raymond et Dr. Verreault pour leur aide très appréciée. Je remercie aussi le FRSQ et les IRSC pour leur soutien financier tout au long de ma maîtrise.

Introduction

L'importance de la stabilité génomique

L'ADN composant le génome de chaque cellule est cruciale pour la survie d'un organisme. C'est ce qui contient l'information génétique essentielle à la production d'ARNs et de protéines, eux-mêmes artisans du bon fonctionnement de toute cellule. Or, l'ADN est constamment soumis à des stress pouvant endommager son intégrité. Ceux-ci peuvent provenir aussi bien du métabolisme que de sources environnementales. Par exemple, plusieurs processus métaboliques produisent des espèces oxygénées réactives qui peuvent endommager l'ADN. La réplication, cruciale à la passation de matériel génétique de cellule mère en cellule fille, est un processus particulièrement critique qui peut engendrer des mutations. L'environnement entourant la cellule peut aussi induire des dommages, que ce soit des rayons UV provenant du soleil, des radiations provenant d'isotopes radioactifs ou d'agents chimique s'attaquant à l'intégrité de l'ADN.

Le type de dommages qui est potentiellement le plus dangereux et nocif pour l'intégrité du génome est le bris double-brin. Celui-ci est caractérisé, comme son nom l'indique, par une coupure des deux brins complémentaires de l'ADN. Si ce type de dommage demeure non réparé, il en résultera une perte d'information génétique qui mènera le plus souvent à la mort cellulaire. De plus, une réparation erronée de ce type de bris peut se traduire en réarrangements chromosomiques majeurs et aussi à la perte d'information génétique. Ceci est d'ailleurs une particularité fréquemment observée dans plusieurs types de cancers. Ainsi, les bris double-brins comportent un potentiel cancérigène et un danger pour la survie de tout organisme.

Fort heureusement, chaque cellule possède des mécanismes capables de répondre à la majorité des dommages à l'ADN. Par exemple, les bris double-brins sont majoritairement réparés par deux voies exclusives et différentes, la recombinaison homologue et la jonction des extrémités non-homologues (JENH). Or, une particularité intéressante est que ces mécanismes et la plupart des composants de ceux-ci ont fortement été conservés au cours de

l'évolution. Ainsi, beaucoup d'avancées scientifiques et de connaissances sur les voies de réponse aux dommages à l'ADN ont été acquises grâce à des modèles simples telle la levure de boulanger, *Saccharomyces cerevisiae*.

Un complexe conservé évolutivement ayant une importance cruciale pour la réparation des bris double-brins a d'ailleurs été en partie identifié à l'aide de la levure *S. cerevisiae*; il s'agit du complexe MRX. Mettant en avant son importance dans le maintien de la stabilité génomique, des mutations hypomorphiques dans les homologues humains des gènes de ce complexe causent des maladies sévères, tel le syndrome de Nijmegen [1] et l'ATLD [2]. Celles-ci sont caractérisées par des troubles développementaux, la microcéphalie, l'immunodéficience, et une forte prédisposition au cancer. Les cellules des patients atteints de ces maladies sont déficientes au niveau de la réponse aux dommages à l'ADN et ont une très grande sensibilité aux agents génotoxiques [2].

Ainsi, le complexe MRX a été caractérisé comme étant impliqué dans plusieurs voies de la réponse aux dommages à l'ADN, notamment au niveau de la réparation des bris double-brins par recombinaison homologue et JENH, la réplication des télomères ainsi que dans les points de contrôle des dommages à l'ADN [3]. Le texte qui suit portera sur toutes ces voies en mettant l'accent sur le rôle joué par le complexe MRX chez *S. cerevisiae* et les différences existantes entre la levure et les eucaryotes supérieurs.

Le complexe MRX

Chez *S. cerevisiae*, le complexe MRX est composé de trois protéines Mre11, Rad50 et Xrs2 (Figure1). Ces dernières ont été identifiées dans des cribles génétiques visant à identifier des mutants sensibles aux agents génotoxiques (*RAD50* et *XRS2*) [4, 5] et incapables d'effectuer la méiose (*MRE11*) [6]. Chaque sous-unité joue un rôle essentiel dans le bon fonctionnement du complexe entier. D'ailleurs, la délétion de toute sous-unité du complexe mène à un phénotype identique d'hypersensibilité aux dommages à l'ADN, qui n'est pas accrue par la délétion d'autres membres du complexe [3]. Ceci démontre donc que ces trois membres doivent agir de concert pour être fonctionnels et que chaque sous-unité ne peut exercer ses fonctions sans la formation du complexe.

Mre11

Mre11 est une protéine multifonctionnelle d'environ 80 kDa qui doit former un duplex pour être active [7, 8]. Elle possède un important domaine de liaison à l'ADN en sa région C-terminale lui permettant de reconnaître et de se lier à l'ADN simple et double-brin, ainsi qu'aux terminaisons en fourches, mais Mre11 se lie préférentiellement aux extrémités d'ADN linéaire [9]. Mre11 possède par ailleurs des motifs conservés appartenant à la famille des phosphoestérases. Des études *in vitro* sur divers substrats d'ADN montrent que ces motifs confèrent des activités exonucléase 3'->5', endonucléase sur de l'ADN simple et double-brin ainsi que de résolution de structures d'ADN en épingles à cheveux lorsqu'en présence d'ions manganèses [10, 11]. De plus, Mre11 peut interagir indépendamment avec Xrs2 et Rad50 par le biais de son domaine nucléase, lui conférant ainsi le rôle de cœur interactif du complexe [12-16].

Rad50

Rad50 est une sous-unité d'environ 150 kDa. Elle est caractérisée par des motifs de liaison aux nucléotides Walker A et Walker B en N- et C-terminal respectivement [17]. Ceux-ci forment ensemble, lorsque rejoints, un domaine ABCatpase (ATP-binding cassette), c'est à dire une structure pouvant lier l'ATP et utiliser l'énergie provenant de son hydrolyse pour induire des changements conformationnels. Rad50 est caractérisé par une longue région formée de répétitions d'heptades pouvant adopter une structure "coiled-coil" [17]. Au centre de cette structure se retrouve un court domaine comportant une séquence fortement conservée C-X-X-C pouvant coordonner un ion de zinc. Ce domaine forme alors une structure "crochet de zinc" qui permet l'homodimérisation de Rad50 [18, 19]. Elle adopte ultimement une structure repliée, c'est à dire que les têtes ATPase se rejoignent, formant le domaine ABCatpase à une extrémité, relié par le long domaine antiparallèle coiled-coil au domaine "crochet de zinc". Rad50 interagirait avec Mre11 à la base du domaine coiled-coil (première répétition d'heptade à partir des motifs Walker A et B), plaçant ainsi têtes les ATPases de Rad50 à proximité du domaine nucléase de Mre11 [16].

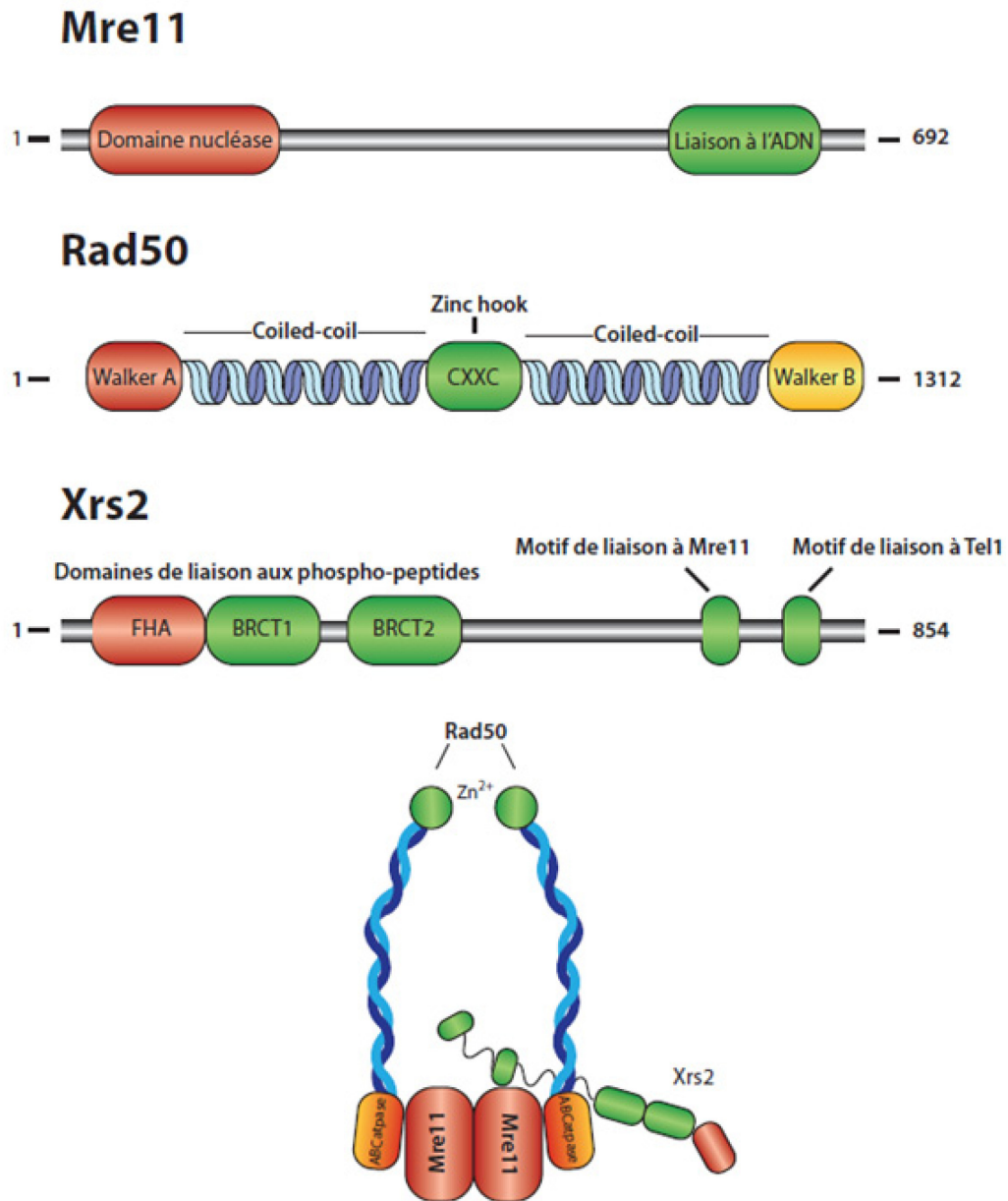


Figure 1. Les composants et la structure proposée du complexe

Xrs2

Xrs2 est la sous sous-unité la moins bien caractérisée du complexe et régule en quelque sorte les fonctions des autres membres. Contrairement à Mre11 et Rad50, la séquence d'acides aminés de Xrs2 diffère largement de celle de son homologue humain, NBS1. Cependant, les fonctions ainsi que certains domaines sont conservés entre Xrs2 et NBS1. Les deux protéines possèdent un domaine Fork-Head-Associated (FHA) juxtaposé à deux domaines BRCT (Breast Cancer C-Terminal) en tandem [20-22]. Toutefois, les domaines BRCT de Xrs2 sont dégénérés et n'ont été identifiés que par analyse bioinformatique [21]. Or, les domaines FHA et BRCT modulent l'interaction avec des phosphothréonines et phosphosérines, respectivement, ce qui suggère que Xrs2 et NBS1 sont des adaptateurs régulés par l'interaction à des protéines phosphorylées. Ces domaines ont la particularité d'être si proches l'un de l'autre sur NBS1 que la liaison d'un domaine FHA ou BRCT à un peptide phosphorylé provoque des changements de conformation dans les autres, créant ainsi la possibilité d'interactions complexes de la protéine [23, 24]. Xrs2/NBS1 interagit avec Mre11 par le biais d'une région en C-terminal de la protéine [15] et possède aussi un domaine d'interaction avec Tel1/ATM (voir section télomères et point de contrôle des dommages à l'ADN) en sa section C-terminale [25, 26].

Tandis que Mre11 et Rad50 sont représentés sous forme d'homodimères dans le complexe MRX/N, Xrs2/NBS1 semble présent sous forme de monomère. En effet, des études biochimiques révèlent que Xrs2/NBS1 est en quantité sous-stoichiométrique par rapport à Rad50 et Mre11 [10, 27]. Cependant, une récente étude chez *Schizosaccharomyces pombe* dans laquelle des domaines de NBS1 et MRE11 ont été co-cristallographiés suggère que NBS1/Xrs2 est sous forme de dimère comme Mre11 dans le complexe [28]. Selon cette étude, les deux molécules de NBS1 lient asymétriquement le dimère de Mre11, et ainsi une molécule de NBS1 a une interaction plus faible avec Mre11. Cette différence d'affinité entre les deux molécules de NBS1 pourrait ainsi expliquer la quantité sous-stoichiométrique de Xrs2/NBS1 détecté par rapport au reste du complexe dans les essais biochimiques.

Le complexe MRX, une unité structurale

Toutes les sous-unités du complexe MRX doivent être exprimées pour que le complexe soit fonctionnel *in vivo*. D'ailleurs, la majorité des fonctions de Mre11 impliquant son activité nucléase est stimulée lorsque accompagnées de Rad50 et Xrs2 *in vitro* [3]. De plus, l'interaction avec l'ADN est plus forte lorsque le complexe est entier [29]. Ceci indique donc que chaque sous-unité pourvoit un apport catalytique (Mre11 et Rad50) et structurel (Mre11, Rad50 et Xrs2), nécessaire au fonctionnement optimal du complexe.

Le complexe entier a une préférence marquée pour les extrémités double-brin d'ADN linéaire. À ce niveau, il peut adopter deux structures. Premièrement, il peut tenir des extrémités double-brins à proximité l'une de l'autre lorsque sous forme de complexe simple (M_2R_2X) (Figure 2A) [27]. Deuxièmement, deux complexes MRX peuvent interagir à longue distance par l'intermédiaire des domaines "crochet de zinc" de Rad50, permettant ainsi de créer un pont entre deux molécules d'ADN double-brins (Figure 2B) [30]. Cette dernière structure a potentiellement un intérêt biologique important, car la réduction de taille des domaines coiled-coils ainsi que la mutation du domaine "crochet de zinc" de Rad50 mène à un phénotype d'hypersensibilité aux dommages à l'ADN [19, 31]. Or, dans tous les cas, la résolution de la structure du complexe dans le cadre de ces deux conformations nous informerai grandement sur ses fonctions.

Plusieurs groupes ont tenté d'élucider sans succès la structure du complexe pour mieux comprendre son rôle au niveau de la réparation de l'ADN. Cependant, la taille du complexe et la difficulté à le cristalliser posent un réel défi. Toutefois, il a été possible de cristalliser certains domaines du complexe, offrant des pistes sur les mécanismes de la régulation structurale du complexe. La co-cristallisation des domaines fonctionnels de Mre11 et Rad50 chez *P. furiosus* ont permis d'élucider l'interdépendance entre l'activité ATPase de Rad50 et l'activité nucléase de Mre11 [32, 33]. En effet, lorsque Rad50 et Mre11 forment un tétramère (M_2R_2), la liaison de l'ATP à Rad50 induit un changement de conformation important favorisant l'activité exonucléase de Mre11. L'hydrolyse de l'ATP provoque un second changement structurel stimulant alors l'activité endonucléase de Mre11. La co-cristallisation de domaines de Mre11 et Nbs1 indique que Nbs1 s'étend vers l'extérieur du complexe (Figure

1). Ceci suggère que Nbs1 agit comme port d'attache flexible permettant l'interaction avec des protéines externes au complexe [28].

Enfin, les fonctions et propriétés de chaque sous-unité permettent de former un complexe flexible et capable de s'adapter à une multitude de substrats devant être réparés. Or, il paraît évident que la structure adoptée par le complexe joue un rôle important dans sa régulation. L'étendue de ses fonctions et des voies dans lesquels il est impliqué laisse suggérer qu'il peut être activement régulé en fonction de son environnement immédiat.

Une machine adaptable et multifonctionnelle

Les bris double-brins "naturels"

La cellule génère naturellement des bris double-brins que ce soit par la réplication ou par la structure intrinsèque des extrémités de chromosome linéaire. Or, le complexe MRX est impliqué dans la régulation de ces bris double-brins naturels de telle sorte que des événements catastrophiques puissent être évités.

La réplication

Bien que ce soit un complexe non-essentiel chez la levure, sa délétion mène à une sensibilité accrue aux dommages survenant durant la réplication. De plus, le complexe MRN est essentiel chez l'humain uniquement chez les cellules en division [34] et il colocalise avec la pince moléculaire PCNA lors de la réplication [35, 36]. Ceci suggère donc un rôle crucial du complexe au cours de la réplication de l'ADN. D'ailleurs, les mutants du complexe MRX chez la levure affichent une progression plus lente du cycle cellulaire et une faible viabilité même en absence d'agents génotoxiques [9]. Ceci suggère que le complexe MRX préviendrait les dommages issus de la réplication prenant souvent la forme de bris double-brins et aussi assurerait une réparation rapide de ces dommages.

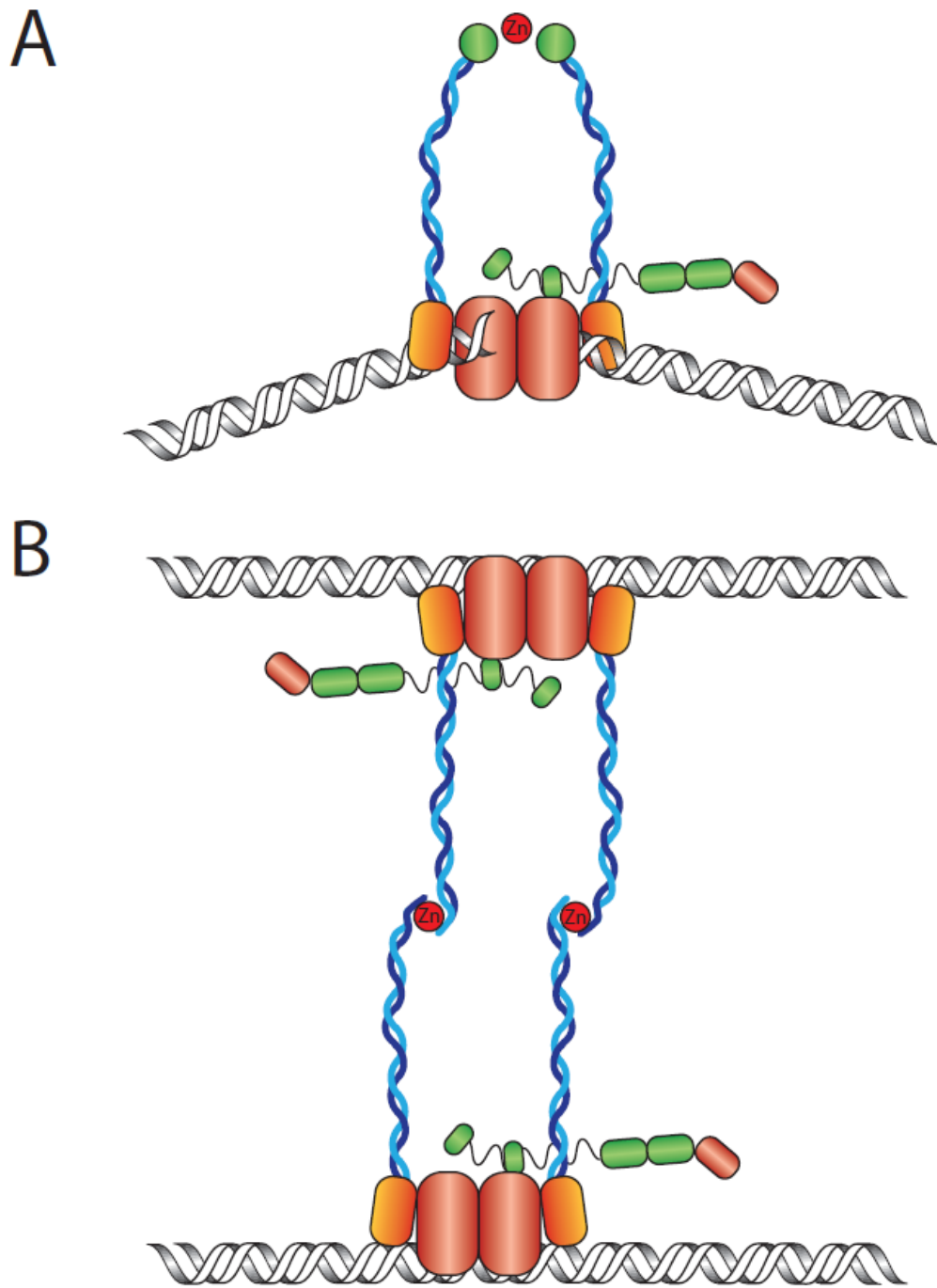


Figure 2. Conformations adoptées par le complexe MRX

Les télomères

Les extrémités des chromosomes linéaires sont potentiellement dangereuses, car elles ressemblent structurellement à des bris double-brins de l'ADN. Ainsi, il serait particulièrement catastrophique qu'une cellule reconnaisse ces extrémités comme des bris double-brins, car ceci résulterait en des réarrangements chromosomiques potentiellement létaux. Pour remédier à ce problème, ces extrémités sont protégées par des structures nucléoprotéiques communément appelées les télomères. Ceux-ci sont caractérisés entre autres par la présence d'une extrémité 3' simple-brin riches en guanosines qui est cruciale pour le recrutement de plusieurs facteurs intervenant dans la stabilisation et la protection des télomères. De plus, le recrutement efficace de ces facteurs aux télomères dépend de la taille de ces derniers, ainsi il est important pour la cellule de maintenir la longueur des télomères.

Or, la réplication des télomères est un processus qui requiert des facteurs additionnels et est alors plus complexe à exécuter que la réplication de l'ADN non-télomérique. En effet, le brin répliqué selon le mode discontinu permettra la formation d'une extrémité 3' simple-brin suite au retrait de l'amorce requise pour la synthèse du fragment d'Okazaki. Toutefois, lors de la synthèse du brin continu, l'extension 3' simple-brin n'est pas présente, ce qui résulte en une extrémité franche. Si le télomère demeurait ainsi, les facteurs importants à la protection de celui-ci ne pourraient être recrutés, ce qui résulterait en une dégradation progressive de l'extrémité du chromosome et potentiellement en réarrangements du génome [37].

Le complexe MRX se lie principalement à l'extrémité synthétisé selon le mode continu [38] et stimule la résection 5'->3' (processus discuté plus loin) de l'extrémité du chromosome, créant ainsi une extrémité 3' simple-brin. Celle-ci est importante pour le recrutement de la télomérase qui pourra ainsi prolonger cette extrémité à l'aide d'une matrice d'ARN. Ainsi, la délétion de tout membre du complexe résulte en des télomères de longueurs stables, mais aussi plus courts [39, 40]. De plus, le complexe MRX, par l'intermédiaire d'un domaine de liaison en C-terminal de Xrs2, permet le recrutement de la kinase Tel1 aux terminaisons de chromosomes [26, 41]. Ce domaine est aussi important pour le maintien des télomères, car sa délétion provoque un phénotype de télomères courts, semblable à la délétion de membres du complexe MRX. De plus ses fonctions aux télomères dépendent de son activité kinase qui active la télomérase [42].

Les processus de réparation des bris double-brins

Les points de contrôle des dommages à l'ADN

Qu'ils proviennent du métabolisme ou de facteurs environnementaux, les bris double-brins doivent absolument être réparés pour éviter des catastrophes. Cependant, les processus de réparation ne sont pas instantanés. Ainsi, pour éviter que de l'ADN endommagé soit mal-répliqué ou qu'il y ait perte d'information génétique entre cellule mère et fille lors de la mitose, la cellule doit absolument ralentir et même arrêter temporairement le cycle cellulaire. Ainsi, suite à la détection de dommages à l'ADN, une cascade de signalisation se lance, stimulant l'arrêt du cycle cellulaire pour permettre à l'ADN d'être réparé. Cet ensemble de voies de signalisation est ce que l'on nomme les points de contrôle des dommages à l'ADN.

À la base de ces points de contrôle, deux kinases conservées de la levure à l'humain, Tel1/ATM et Mec1/ATR, ont un rôle essentiel dans la stabilité génomique. Ce sont deux kinases de haut poids moléculaire, 321 et 273 kDa respectivement chez la levure, qui appartiennent à la famille des phosphoinositide (PI)-3-kinases. Ces deux kinases, jouent un rôle central dans l'activation des points de contrôle, mais selon des processus différents [3, 43]. Chez la levure, Mec1 forme un complexe avec Ddc2 [44, 45] et est activée par l'interaction avec l'ADN simple-brin protégé par l'hétérotrimère RPA [46] (souvent formé à la suite de bris double-brins, voir section recombinaison homologue). La cascade de signalisation débute par la phosphorylation et l'activation de Rad9 par Mec1 [47, 48] ce qui stimule l'activité de Mec1 et résulte en la phosphorylation des kinases effectrices Chk1 et Rad53 [49-51]. La pince moléculaire Rad17-Mec3-Ddc1 est recrutée indépendamment de Mec1 aux bris double-brins, mais est aussi requise pour l'activité maximale de Mec1 et des points de contrôles [52, 53]. Chk1 et Rad53 phosphoryleront à leur tour plusieurs substrats qui auront pour effet, entre autres, d'arrêter la progression du cycle cellulaire et de stimuler la transcription de facteurs de réparation de l'ADN [54-56]. Ces mécanismes sont fortement conservés à travers les espèces et il existe des homologues de chacun de ces facteurs chez l'humain à l'exception de Rad9 dont les fonctions semblent effectuées par un groupe de protéines incluant BRCA1 et 53BP1.

Tel1 et son homologue humain ATM sont activés par la formation de bris double-brins et recruté à ceux-ci par l'intermédiaire de l'interaction avec le domaine en C-terminal de

Xrs2/NBS1 [25, 26]. Alors qu'ATM est très important pour les points de contrôles chez les eukaryotes supérieurs, Tel1 semble jouer un rôle mineur. Chez l'humain, des mutations inactivatrices d'ATM entraînent une maladie sévère : l'ataxia telangiectasia (AT). Les cellules des patients atteints ne provoquent pas un arrêt du cycle cellulaire complet suite à l'induction de bris double-brins provenant de radiation gamma ou de la réplication. De plus, leurs cellules sont caractérisées par une hypersensibilité à ce type de dommages [57]. Chez la levure cependant, la délétion de *TEL1* ou la troncation de la région en C-terminal de Xrs2 ne résulte pas en une sensibilité aux agents génotoxiques [26]. De plus, Tel1 ne semble importante pour la phosphorylation de la kinase effectrice Rad53 que lorsque Mec1 est déléetée [26, 58]. Ainsi, les points de contrôles des dommages à l'ADN dépendent plus de Mec1 que de Tel1.

Or, le complexe MRX/N est aussi important pour l'activation des points de contrôle. Les cellules de patients atteints de NBS et ATLD, qui sont des maladies issues de mutations dans NBS1 et MRE11 respectivement, affichent un phénotype similaire à celui de cellules de patients atteints d'AT; c'est à dire qu'elles sont défailantes dans l'activation des points de contrôles et sont hypersensibles aux dommages à l'ADN [57, 59]. Chez la levure, malgré le rôle mineur du recrutement de Tel1 dans les points de contrôle, le complexe MRX est important pour l'activation de ceux-ci. En effet, la délétion de tout membre du complexe résulte en des défauts d'activation des points de contrôles [9, 60]. Ceci peut être expliqué par le fait que le complexe est aussi impliqué dans la génération d'extrémités 3' simple brins aux bris double-brins (voir section recombinaison homologue), ce qui serait favorable pour l'activation de Mec1.

Or, il est intéressant de noter que chez la levure et l'humain, Mre11 et Xrs2/NBS1 ont été identifiés comme substrats pour la phosphorylation par Tel1/ATM [9, 58, 61, 62] et aussi en partie par Mec1 [9, 58]. Chez NBS1 la phosphorylation des sérines 278 et 343 par ATM est importante pour l'activation des points de contrôles et pour la réponse aux dommages à l'ADN en général [61]. Cependant, les sites phosphorylés ainsi que le rôle de cette phosphorylation n'ont pu être identifiés chez *S. cerevisiae* [63]. Les kinases des points de contrôle stimulent les voies de réparation de dommages à l'ADN [64, 65], ce qui pourrait impliquer la régulation par la phosphorylation du complexe MRX/N. D'ailleurs, en parallèle à son rôle dans les points de contrôle des dommages à l'ADN, le complexe MRX/N est crucial aux processus de réparation

des bris double-brins, notamment par les voies de recombinaison homologue et de JENH qui seront discutées en plus amples détails dans les prochaines sections.

La recombinaison homologue

La recombinaison homologue est un mode de réparation des bris double-brins complexe qui nécessite une panoplie de facteurs et de sous-processus. Malgré sa complexité, c'est un mécanisme de réparation très bien conservé dans l'évolution. La recombinaison homologue est particulièrement efficace chez la levure et ainsi la vaste majorité du mécanisme a été élucidé à partir de ce modèle. C'est un type de réparation qui requiert, comme son nom l'indique, une zone d'homologie servant de matrice pour la réparation. En général, la chromatide sœur est préférentiellement utilisée comme matrice pour réparer le bris double-brin ce qui fait en sorte que le processus de recombinaison homologue a principalement lieu après la réplication de l'ADN. En sa plus simple expression, ce processus se résume comme suit. Lorsqu'un bris double-brin est détecté par la cellule, les extrémités subissent ce qui est communément nommée la résection. Il s'agit en fait d'un processus exonucléolytique 5'→3' générant une extrémité 3' simple-brin (Figure 3A). Cette extrémité permet alors la recherche de zones d'homologie à l'aide de recombinaisons.

L'extrémité 3' simple brin pourra ensuite envahir l'ADN homologue, s'hybridant au brin matrice et déplaçant ainsi le brin complémentaire. Ceci forme une première jonction d'Holliday et une boucle en D qui s'hybridera au second brin de l'ADN endommagé (Figure 3B). Le brin matrice ainsi que la boucle D sont ensuite utilisés pour la polymérisation de l'interstice formé par le bris double-brin et la résection (Figure 3C). S'ensuit la ligation des terminaisons nouvellement synthétisées (Figure 3D). Ceci résulte en la formation d'une seconde jonction d'Holliday. La résolution des jonctions d'Holliday peut alors avoir lieu avec ou sans cross-over (Figure 3E et F).

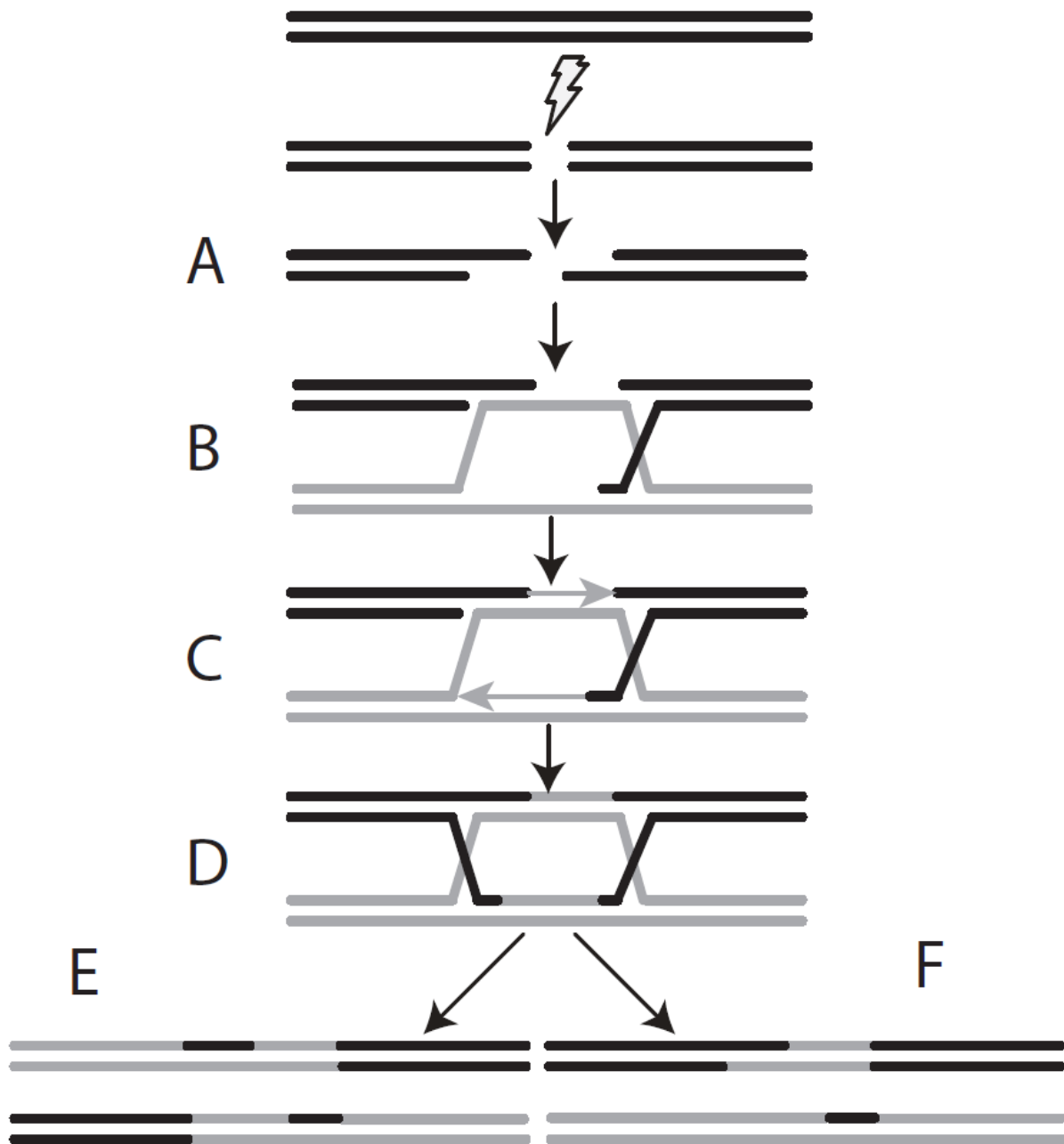


Figure 3. Schéma explicatif du processus de recombinaison homologue

La résection, une étape cruciale de la recombinaison homologue qui dépend du complexe MRX

La formation de l'extrémité 3' simple-brin par la résection est une étape particulièrement importante pour la voie de recombinaison homologue, car c'est ce brin d'ADN qui sert de substrats aux étapes subséquentes. Donc, au fur et à mesure que la résection progresse, le trimère RPA se charge sur l'extension 3' simple-brin, ce qui a pour effet de protéger l'extrémité contre la dégradation en plus de favoriser l'activation des points de contrôle des dommages à l'ADN. RPA est par la suite déplacé et remplacé par Rad51, un processus catalysé par Rad52. Ceci forme ainsi un nucléofilament de Rad51 qui sera stabilisé et protégé par l'hétérodimère Rad55-Rad57. Cette structure est cruciale pour la recombinaison homologue et coordonnera la recherche de séquences homologues. L'invasion de l'ADN homologue et la formation de la boucle en D seront accomplies par les fonctions catalytiques de Rad51 avec l'aide de Rad54 et Rdh54 [66].

Le complexe MRX est donc principalement impliqué dans la première étape clé de la recombinaison homologue, c'est-à-dire la résection et la formation de l'extrémité 3' simple-brin. Il est l'un des premiers facteurs à être recruté aux bris double-brins où il stimule en collaboration avec l'endonucléase Sae2 le processus de résection 5'→3' [67]. Paradoxalement, le complexe MRX-Sae2 (MRX-S), par le biais de Mre11, possède activité nucléase 3'→5' qui a une polarité inverse de celle observée aux bris double-brins [68]. De plus, son activité nucléase n'affecte pas la cinétique de résection aux bris double-brins induits par des endonucléases [69]. La délétion de toute sous-unité du complexe et de Sae2 retarde le processus de résection, sans toutefois l'inhiber complètement [69, 70]. Des études *in vivo* et *in vitro* démontrent qu'il existe deux voies exonucléiques redondantes responsables de la résection extensive 5'→3' [71, 72]. La première voie dépend de l'exonucléase Exo1 et la seconde d'un groupe de protéines incluant l'hélicase Sgs1 et l'exonucléase Dna2 [73]. La délétion de chacune de ces voies individuellement inhibe la résection, mais pas complètement, tandis que la perturbation des deux élimine presque entièrement la résection [74].

Le complexe MRX-S stimule l'activité nucléase des voies d'Exo1 et de Sgs1-Dna2 *in vitro* et *in vivo* [67, 71, 72]. Plusieurs études proposent que le complexe MRX-S permettrait le clivage d'un court oligonucléotide en 5' modifiant ainsi la structure de l'extrémité double-brin.

Ceci permettrait par la suite le recrutement des deux voies exonucléolytiques 5'->3' Sgs1-Dna2 et Exo1 [73]. Le domaine nucléase de Mre11 semble jouer un rôle mineur dans ce contexte [75]. En effet, des mutations inactivant totalement les activités nucléases de Mre11 résultent en une faible sensibilité à plusieurs agents génotoxiques [69, 76]. Cependant, les fonctions nucléases de Mre11 sont importantes pour la résection en absence de l'hélicase Sgs1, ce qui suggère un rôle du domaine nucléase pour le déroulement de l'ADN [69]. Cette ouverture d'ADN serait donc importante pour la résection par Exo1 et pourrait être compensée par Sgs1 lorsque l'activité nucléase de Mre11 est neutralisée.

La méiose, un processus particulier qui requiert la recombinaison homologue

Plusieurs fonctions de protéines impliquées dans la recombinaison ont été élucidées grâce à la méiose chez la levure. Il s'agit en effet d'un brassage contrôlé de l'information génétique dans lequel la recombinaison homologue joue un rôle crucial. Lors de la méiose I, Spo11, une endonucléase, est recrutée à des régions spécifiques du génomes où elle clive l'ADN pour former des bris double-brins et se lie de manière covalente aux extrémités 5' de ceux-ci [77]. Cette étape de clivage dépend de la présence du complexe MRX puisque dans des mutants inactivant le complexe MRX, Spo11 est toujours recruté à l'ADN sans toutefois induire de bris double-brin, ce qui résulte en un arrêt de la méiose et une forte inhibition de la sporulation [78].

Dans le contexte de la méiose, l'activité nucléase de Mre11 est indispensable. Des mutants inactivant les fonctions nucléase de Mre11 n'empêchent ni le recrutement du complexe au site lié par Spo11, ni la formation du bris double-brin, mais ces mutants ne peuvent traiter enzymatiquement les extrémités double-brins liées de manière covalente à Spo11 [76, 79]. Une récente étude propose donc un modèle en deux étapes selon lequel le complexe MRX-Sae2 cliverait en premier lieu l'ADN environ à 300 paires de base de distance au site lié à Spo11. Par la suite, l'activité exonucléase 3'->5' de Mre11 entrerait en jeu, résectant l'ADN vers le site de liaison à Spo11, suivit de l'activité exonucléase 5'->3' de Exo1 formant alors une longue extrémité 3' simple-brin. Ceci résulterait donc en une résection bidirectionnelle à partir du premier clivage par MRX-Sae2 [76].

Il est intéressant de noter qu'en cellules mitotiques, les mutants déficients en fonction nucléase de Mre11 sont faiblement sensibles au méthylméthane sulfonate (MMS), un agent qui alkyle les bases et qui dépend des polymérase répliquatives pour former des bris double-brins. Cependant ils sont sensibles aux poisons de topoisomérases I telle la camptothecin qui résulte en un bris double-brin lié de manière covalente par la topoisomérase [76]. Ceci indique donc que l'activité nucléase de Mre11 est importante pour certains types de dommages à l'ADN, mais est accessoire à d'autres.

La structure adoptée par le complexe MRX lors de la recombinaison homologue

La réplication est un processus qui sollicite souvent la voie de recombinaison homologue, car des bris double-brins peuvent survenir fréquemment. Le modèle actuel propose que le complexe MRX soit recruté aux fourches de répliquations et qu'il adopte une structure de pont interchromatidien (Figure 2B) [80]. C'est-à-dire que deux complexes MRX sont liés chacun aux chromatides sœurs et interagissent ensemble par l'intermédiaire des domaines "crochet de zinc" de Rad50. Supportant ce modèle, la mutation des cystéines conservées de ce domaine provoque un phénotype similaire à la délétion de *RAD50* [18]. De plus, la longueur du domaine coiled-coil joue potentiellement un rôle, car des mutants ayant ce domaine rétréci sont aussi sensibles que la délétion de *RAD50* [31].

Selon cette structure, il est en effet facile d'imaginer que le complexe MRX puisse stabiliser les chromatides sœurs ensemble pour ainsi faciliter la recombinaison homologue en cas de bris double-brins induits lors de la réplication. De plus, ce modèle est aisément transposable au processus de recombinaison homologue indépendamment de la réplication, car les domaines "crochet de zinc" et coiled-coil de Rad50 sont aussi importants pour diriger le choix de l'homologie vers la chromatide sœur. En effet, des mutations dans ces domaines résultent en une augmentation de recombinaison avec le chromosome homologue [31].

La jonction d'extrémités non-homologues

Le JENH est une autre voie importante pour la réparation des bris double-brins de l'ADN. Celle-ci est par contre conceptuellement beaucoup plus simple que la recombinaison homologue. En effet, ce processus se traduit généralement par la jonction des extrémités du

bris double-brin. Or, si ces extrémités sont endommagées ou perdues lors de la formation du bris double-brin, il y aura perte d'une partie de l'information génétique. Ainsi, le JENH est beaucoup plus propice aux erreurs et est donc plus mutagénique que la recombinaison homologue.

Trois groupes de protéines sont essentiels à ce type de réparation chez *S. cerevisiae*, soit l'hétéroduplexe formé de Yku70 et Yku80, le groupe Dnl4-Lif1-Nej1 ainsi que le complexe MRX. L'un des premiers éléments à être recruté aux bris double brins est le complexe Yku70-Yku80 où il forme un anneau dans lequel s'insère l'extrémité libre du bris double-brin. Le complexe MRX est aussi rapidement recruté aux bris double-brins et joue un rôle structurel pour le JENH. En effet, le complexe permet *in vitro* de former des oligomères à partir de substrats d'ADN double-brins linéaires [27]. Ceci suggère donc qu'il maintient *in vivo* les extrémités du bris double-brin près l'une de l'autre favorisant ainsi l'étape de ligation. Dnl4 (DNA ligase IV) est la ligase responsable de la jonction finale des extrémités du bris double-brin. Dnl4 est recrutée aux bris double-brins par l'intermédiaire d'interaction entre Lif1 et Nej1 et le dimère Yku70/Yku80 [27, 81, 82]. Le complexe MRX travaille aussi de concert avec le complexe Yku70-Yku80 pour le recrutement du complexe Dnl4-Lif1-Nej1. À cet égard, l'interaction entre le domaine FHA de Xrs2 et les thréonines T387 et T417 de Lif1 est importante [83, 84].

La levure répare cependant difficilement les bris doubles-brins dont les bases aux extrémités ont été endommagées par des radiations gamma [85, 86], car elle ne possède pas de nucléase spécialisée du JENH permettant d'éliminer les bases endommagées. Chez l'humain, la voie de JENH est plus sollicitée pour la réparation des bris doubles-brins et est aussi plus spécialisée. Les cellules humaines possèdent ainsi quelques facteurs supplémentaires permettant de réparer l'ADN indépendamment du type de dommages. En plus de posséder des homologues de tous les facteurs de JENH (Dnl4 = DNA ligase IV, Lif1 = XRCC4, Nej1 = XLF) les eucaryotes supérieurs possèdent notamment une nucléase spécifique au JENH, Artemis, qui a pour fonction d'éliminer les bases endommagées [87]. L'humain possède aussi la DNA-PK (DNA-dependent protein kinase) qui forme un complexe avec KU70-KU80 aux bris double-brins et qui est importante pour l'alignement de micro-homologies pour le JENH lorsque des bases sont éliminées [88]. Des trous simple-brins sont forcément formés lors de

l'alignement des homologies et sont remplis par deux polymérase, μ et λ [89-91], permettant ainsi la ligation des extrémités du bris. Le complexe MRN est aussi important chez l'humain pour le JENH [92] et semble jouer un rôle d'échafaudage au niveau du bris double-brin. Cependant, à ce jour, aucune interaction directe entre XRCC4 et le domaine FHA n'a pu être identifiée. De plus, les fonctions nucléase de MRE11 semblent importantes pour une voie alternative de JENH qui requiert une certaine résection au niveau du bris double-brin pour révéler des zones de microhomologies [65, 93].

Outre son rôle dans la réparation des bris double-brins aléatoires, la voie de JENH est aussi importante chez les eucaryotes supérieurs pour le bon fonctionnement du système immunitaire. En effet, la voie de recombinaison V(D)J est un mécanisme programmé des lymphocytes B et T au cours duquel les gènes des loci d'immunoglobulines et de récepteurs de cellules T sont réarrangés pour générer l'immense répertoire d'anticorps. Chez les lymphocytes immatures, les protéines RAG1 et RAG2 interagissent ensemble et induisent des bris double-brins aux séquences RSS (Recombination signal sequence) qui flanquent les gènes V, D et J. Les bris double-brins engendrés par RAG1/2 produisent des structures en épingle à cheveux aux terminaisons des séquences codantes des gènes d'immunoglobulines. Celles-ci sont résolues par la nucléase Artemis qui est stimulée par la présence de DNA-PKcs. Quelques nucléotides aléatoires P (1-3) sont ensuite ajoutés aux extrémités des bris double-brins par les polymérase μ et λ . D'autres nucléotides aléatoires (N) par la suite ajoutés par l'enzyme terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT). Ces deux étapes d'ajout de nucléotides aléatoires ont pour rôle d'amplifier la diversification des immunoglobulines. La ligation des deux extrémités du bris double-brin est finalement effectuée par le complexe ligase (Ligase IV, XRCC4 et XLF) [94]. Le complexe MRN semble jouer un rôle dans ce processus, puisque les patients atteints du syndrome de Nîmègue souffrent d'immunodéfiance, notamment du à une quantité significativement plus faible de lymphocytes [95]. Il a été proposé que le complexe MRN soit requis pour la résolution des extrémités en épingle à cheveux puisque MRE11 possède une activité nucléase capable de résoudre ces structures *in vitro*. Cependant, aucune étude n'a pu démontré de défauts à ce niveau chez des mutants du complexe. En fait, une plus récente étude suggère le complexe MRN maintient les extrémités du bris double-brins facilitant ainsi la réparation et la viabilité des lymphocytes [95].

Ainsi, la voie de JENH a une importance majeure, particulièrement chez les eucaryotes supérieurs, dans le maintien de l'intégrité génomique. Il est intéressant de noter que le rôle d'échafaudage du complexe MRX/N est conservé au cours de l'évolution, malgré une complexification de cette voie de réparation.

L'intégration des multiples fonctions du complexe MRX au cours du cycle cellulaire

Bras de fer entre la recombinaison homologue et le JENH

L'implication du complexe MRX dans les deux voies de réparation des bris double-brins soulève une problématique conceptuelle, car ce sont deux voies mutuellement exclusives. Le JENH requiert peu ou pas de modifications des extrémités de l'ADN double-brins, tandis que la recombinaison homologue requiert une résection 5'-3' extensive. Au point de vue moléculaire, tout semble se jouer à cette première étape de résection.

En effet, lors de la recombinaison homologue, le complexe MRX-Sae2 intervient préalablement à l'étape de résection extensive du bris double-brin. L'hétérocomplexe Ku70/Ku80, un membre central de la voie de JENH, se lie spécifiquement aux extrémités double-brins de l'ADN, similairement au complexe MRX. Cependant, Ku70/80 inhibe la recombinaison homologue en compétitionnant avec le complexe MRX et la machinerie de résection pour les extrémités double-brins. En l'absence du complexe MRX-S, la résection est retardée. Or, l'absence de complexe Ku70/80 fonctionnel supprime ce phénotype, indiquant que le complexe MRX dissocie activement le complexe Ku70/80 des extrémités double-brins [69, 71, 96].

Le complexe ku70/80 n'inhibe pas la résection avec la même efficacité aux différents stades du cycle cellulaire. En effet, en phase G1 le complexe ku70/80 inhibe fortement la résection, tandis que son effet est beaucoup plus modeste en phase G2/M du cycle cellulaire. Ceci suggère que l'efficacité de la dissociation du complexe Ku70/80 de l'ADN par le complexe MRX dépend de la phase du cycle cellulaire [97]. Ceci concorde avec la notion que

la recombinaison homologue, un mécanisme de réparation fiable générant peu d'erreurs, est favorisée en phase S et G2/M lorsque la chromatide sœur est présente pour servir de matrice. Le JENH, qui est plus propice aux erreurs est donc restreint à la phase G1, lorsque la recombinaison homologue ne peut avoir lieu [98, 99].

Il est intéressant de noter que la balance entre les voies de réparation des bris double-brins diffère entre les espèces et même entre les différents types cellulaires d'une même espèce. Notamment, alors que réparation la levure repose principalement sur la recombinaison homologue pour la réparation des bris double-brins, les cellules humaines dépendent beaucoup plus de la voie du JENH. Cependant, chez la plupart des espèces, la recombinaison homologue est stimulée après que l'ADN ait été répliqué en fin de phase S et en phases G2/M dans les cellules cyclantes [100].

Cdc28 coordonne le maintien de l'intégrité génomique

Ainsi, la progression du cycle cellulaire semble jouer un rôle majeur dans la stabilité génomique. Celle-ci est orchestrée par les kinases dépendantes des cyclines (CDK) chez tous les eucaryotes. La levure *S. cerevisiae* ne possède qu'une seule CDK régulant le cycle cellulaire, Cdc28. L'activité et la spécificité de Cdc28 sont modulées par l'interaction avec des cyclines dont l'expression est régulée au cours du cycle cellulaire. Par exemple, en phase G1, Cln1 est exprimée et son interaction avec Cdc28 permet à Cdc28 à d'interagir et de phosphoryler des substrats ayant un rôle dans cette phase. En phase G2/M, ce sont les cyclines de type B, telle Clb2 qui sont actives et qui forment un complexe avec Cdc28 [101].

Une importante étude du laboratoire Kolodner révèle que l'activité de Cdc28 est nécessaire pour plusieurs voies impliquées dans la réponse aux dommages à l'ADN. En effet, des analyses avec un mutant chimiosensible de Cdc28 montre que celui-ci interagit génétiquement avec plusieurs voies telles la recombinaison homologue et la réplication des télomères, mais très peu avec la voie du JENH et le point de contrôle des dommages à l'ADN [102]. Cdc28 contribue donc activement à certaines voies impliquées dans la réponse aux dommages à l'ADN, mais pas à d'autres. Ainsi, ceci suggère que Cdc28 coordonne la réponse aux dommages à l'ADN selon la phase du cycle cellulaire.

Il a été démontré que l'activité de Cdc28 était requise pour le processus de recombinaison homologue en mitose [103, 104]. Plusieurs facteurs impliqués dans la recombinaison homologue ont été identifiés comme étant des substrats phosphorylés par Cdc28 en phase G2/M du cycle cellulaire. Notamment, la phosphorylation de Sae2 par Cdc28 sur la sérine 267 est cruciale pour le rôle de Sae2 dans l'étape de résection de la recombinaison homologue. En effet, la mutation en alanine de ce résidu, abrogeant la phosphorylation de celui-ci, inhibe le traitement du bris double-brin par le complexe MRX-Sae2. De plus, cette mutation se traduit en une forte sensibilité aux agents génotoxiques à un niveau comparable à la délétion de *SAE2* [105]. Similairement, Dna2, un facteur impliqué dans la résection extensive aux bris double-brins, a récemment été identifié comme substrat de Cdc28. La phosphorylation par Cdc28 sur trois résidus de Dna2 permet son recrutement aux bris double-brins et aussi active ses fonctions lors de la résection [106]. Des évidences suggèrent aussi que Cdc28 phosphorylerait une hélicase, Srs2, stimulant alors la formation de boucle D plus loin dans la voie de recombinaison homologue [107]. La stimulation de la voie de résection par les CDK semble conservée chez les eucaryotes supérieurs où quelques substrats de CDK ont été identifiés dans ce contexte. Notamment, CtIP, l'homologue de Sae2 est phosphorylé par CDK activant alors ses fonctions au niveau de la résection [108].

La réplication des télomères est aussi un processus régulé par Cdc28. En effet, la résection 5'→3' qui y est observée dépend de l'activité de Cdc28 [109], mais un seul substrat lui a été identifié comme pertinent à l'élongation des télomères : Cdc13. Ce dernier est un facteur important pour la protection et le maintien de l'intégrité des télomères. Paradoxalement, Cdc13 interagit avec deux complexes qui régulent positivement (Est1-Téломérase [110]) ou négativement (Stn1-Ten1 [111]) l'élongation des télomères. La phosphorylation de Cdc13 par Cdc28 stimulerait ainsi en fin de phase S l'interaction avec la téломérase, induisant par la même occasion l'élongation des télomères [112]. Ceci offrirait donc une courte fenêtre dans laquelle les télomères sont plus accessibles limitant alors les événements catastrophiques pouvant survenir aux télomères.

L'activité kinase de Cdc28 est donc importante pour les processus de réponses aux dommages à l'ADN ayant lieu en fin de phase S et en phase G2/M du cycle cellulaire. Ceci suggère donc que Cdc28 en complexe avec des cyclines mitotiques de type B coordonne les

mécanismes de maintien de l'intégrité génomique de telle sorte qu'ils soient plus efficaces et moins propices aux erreurs. Cependant, les substrats identifiés ci-dessus ne peuvent être responsables de toute la coordination engendrée par Cdc28, ce qui suggère que d'autres substrats sont probablement phosphorylés par Cdc28.

Le complexe MRX, déterminant des voies de réparation?

Les fonctions dans lesquelles le complexe MRX/N est impliqué sont régulées au cours du cycle cellulaire. Notamment, la recombinaison homologue et la réplication des télomères, requièrent l'activité de Cdc28 en phase S et G2/M. Par contre, le complexe est aussi important pour la réparation de bris double-brins par JENH qui a lieu majoritairement en phase G1 et dans laquelle l'activité de Cdc28-Clb est superflue. De plus, le complexe MRX semble adopter des conformations différentes selon le mode de réparation.

Le complexe MRX est l'un des premiers facteurs à être recruté aux bris double-brins, alors il paraît évident qu'il puisse contribuer au choix des voies de réparation. Ceci présuppose donc une régulation cycle-cellulaire-dépendante du complexe MRX. Or, Mre11 et Xrs2 comportent plusieurs sites Ser/Thr-Pro, consensus minimal pour la phosphorylation par Cdc28. Plusieurs de ceux-ci ont d'ailleurs été confirmés dans des études de spectrométrie de masse à grande échelle. Cependant, Xrs2 et Mre11 sont aussi phosphorylés en réponse aux dommages à l'ADN par les kinases des points de contrôle des dommages à l'ADN, Tel1 et Mec1. Les points de contrôles peuvent être activés à toute phase du cycle cellulaire lorsque des dommages à l'ADN sont détectés. Ceci suggère donc une seconde étape de régulation du complexe MRX par la phosphorylation indépendante du cycle cellulaire.

Ainsi, dans l'article qui suit nous nous sommes intéressés à la régulation du complexe MRX par la phosphorylation cycle cellulaire et dommages à l'ADN-dépendante. Nous nous sommes également penchés sur la relation entre ces deux événements de modification du complexe MRX.

Contribution de l'étudiant

J'ai contribué à 90% à la réalisation de l'article ci-joint. J'ai réalisé toutes les expériences sous-jacentes aux Figures de l'article, à l'exception de la Figure S2. J'ai contribué à l'élaboration des hypothèses et d'expériences pour vérifier celles-ci ainsi qu'à l'analyse des résultats. De plus, j'ai grandement participé à l'élaboration de la logique ainsi qu'à la rédaction du texte de l'article.

Phosphorylation-dependent regulation of the Mre11 complex influences the DNA repair pathway preference in mitosis

Antoine Simoneau, Anne-Marie Ladouceur 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

ABSTRACT

Homologous recombination and non-homologous end joining (JENH) are the main pathways ensuring the repair of DNA double-stranded breaks (DSBs) in eukaryotes. It has long been known that cell cycle stage is a major determinant of the type of pathway used by cells to repair DSBs. However, the mechanistic basis for the cell cycle regulation of the DNA damage response is still unclear. We show here that a major DSB sensor, the Mre11-Rad50-Xrs2 (MRX) complex, is regulated by cell cycle-dependent phosphorylation specifically in mitosis. This modification depends on the cyclin-dependent kinase Cdc28/Cdk1, and abrogation of Xrs2 and Mre11 phosphorylation results in a marked preference for DSB repair through JENH. Importantly, in the absence of Cdk1 phosphorylation, effective JENH requires DNA damage-induced phosphorylation of MRX components. Therefore, the mitotic regulation of the MRX complex is functionally distinct from its Tel1/ATM-mediated regulation in response to DNA damage. Taken together, our results unravel an intricate network of phosphoregulatory mechanisms that act through the MRX complex to modulate DSB repair efficiency during mitosis.

INTRODUCTION

DNA is subject to multiple types of damages resulting from inherent cell metabolism or environmental hazards. The formation of a DNA double-stranded breaks (DSBs) is one of the most damaging event for a cell as it can result in gross chromosomal rearrangements or cell death if improperly repaired (reviewed in [113]. In yeast and humans, this type of DNA damage is repaired by two fundamentally different mechanisms: non-homologous end-joining (NHEJ) and homologous recombination (HR). It has been established over the last several years that those two processes can compete for the repair of DSBs [114, 115]. Since this competition can sometimes lead to negative consequences on cell survival [86, 115], the regulation of the balance between NHEJ and HR has become a question of major importance for our understanding of DSB repair in eukaryotes (reviewed in [98, 99].

Cell cycle progression from interphase to mitosis has been identified as a major determinant that governs the preference for either NHEJ or HR during DSB repair. Indeed, it is now well established that HR is the preferred DSB repair pathway when sister chromatids are available in late S/G2 and M phases of the cell cycle. In contrast, NHEJ can occur at any time during the cell cycle, but is mostly favored in G1, when no sister-chromatid is present (reviewed in [98, 99]. The cyclin-dependent kinase Cdk1 is a major factor responsible for the promotion of HR over NHEJ in the late stages of the cell cycle [103, 104]. A key target in this process is the CtIP/Sae2 protein, whose phosphorylation by Cdk1 has been shown to stimulate DNA end resection and HR [105, 108]. The cell cycle-dependent expression of CtIP/Sae2 protein also contributes to the mitosis-specific promotion of end resection [116, 117]. More recently, it was reported that phosphorylation of Dna2 by Cdk1 also plays an important role in determining the extent of DSB end resection [106]. Since other DNA repair factors are targets of Cdk1 (*e.g.*, [118]), it is likely that the stimulation of HR in mitosis is coordinated at multiple levels of the DNA damage response (DDR) [98].

Although recent work has provided important insights into the mechanisms that stimulate HR in the late stages of the cell cycle, it is not yet clear whether this preferential use of HR also requires active suppression of the NHEJ pathway. This question is relevant because NHEJ components such as the Ku70/80 complex can inhibit HR repair at a stage that precedes

the end resection step of this pathway [86, 97, 119]. It is thus possible that the rapid recruitment of the Ku70/80 complex to DSBs could suppress the stimulatory effects of Cdk1 on end resection and, ultimately, prevent the establishment of a positive bias for HR in mitosis. Consistent with this view, it was recently demonstrated that the Ku70/80 complex is actively displaced from DNA ends during mitosis [69, 97, 119]. This removal is mediated in yeast by the Mre11-Rad50-Xrs2 (MRX) complex, a central regulator of DSB repair in eukaryotes [3, 80]. The MRX complex is unique among DSB repair factors in that it plays critical roles in both NHEJ and HR repair pathways, and it is one of the first components of the DNA damage response to be recruited to DSBs *in vivo*. As such, this complex is well placed to modulate the balance between NHEJ and HR in mitosis. This view is supported by the fact that Mre11 acts together with a key target of Cdk1, CtIP/Sae2, to promote the initial resection step of HR in mitosis [67, 105, 108]. Recent studies have also shown that Cdk1/2 modulate DSB repair by direct modification of the Nbs1 protein in human cells [120, 121]. Whether the Cdk1 regulation of the Mre11 complex components promotes HR in mitosis by also suppressing competition from the NHEJ pathway is a key unanswered question.

In the present study, we address this important question by showing that the MRX complex promotes DSB repair by NHEJ in a phosphorylation-dependent manner. In particular, we reveal that two subunits of the complex, Mre11 and Xrs2, are targeted by Cdk1 phosphorylation as cells progress into mitosis. We found that this phosphorylation specifically inhibits NHEJ, whereas removal of the phospho-sites in Xrs2 and Mre11 stimulates DSB repair by NHEJ. We also show that the DNA damage-induced phosphorylation of the MRX complex is functionally distinct from the Cdk1-dependent regulation of this complex. Altogether, we demonstrate that the MRX complex promotes DNA repair by acting as a central integrator of various phosphoregulatory signals during the cellular response to DNA damage.

RESULTS

DNA damage-independent phosphorylation of Xrs2 during the cell cycle

Previous studies have demonstrated that members of the MRX complex are regulated by phosphorylation in response to DNA damage [9, 58, 60]. We noticed that even in the absence of DNA damage Xrs2 migrates as a diffuse band during electrophoresis and considered the possibility that Xrs2 might be a substrate for a cell cycle-regulated kinase. To verify this hypothesis, we arrested an exponential culture of yeast cells in G1 using alpha-factor and subsequently released this population of cells into a synchronous cell cycle. Samples were taken at regular intervals to evaluate Xrs2 electrophoretic mobility together with the appearance of cell cycle landmarks (*i.e.*, budding, mitotic spindle length and DNA synthesis). This analysis revealed that –depending on cell cycle stage– Xrs2 migrates as two bands with distinct electrophoretic mobilities in acrylamide gels. Specifically, prior to S phase, Xrs2 migrated mostly as a single band (Fig. 1A-C; times 0-30). A second band with reduced electrophoretic mobility accumulated above the main band of Xrs2 as cells progressed through S phase and into mitosis (Fig. 1A-C; times 40-50). The relative intensity of the slow-migrating band became maximal during the period corresponding to the end of DNA replication up to metaphase (Fig. 1A-C; times 50-80). Passage through anaphase, execution of mitotic exit, and return to interphase (Fig. 1B-C) were associated with a progressive reduction in the relative importance of the slow-migrating species of Xrs2 (Fig. 1A-B; times 90-120). We conclude from this experiment that Xrs2 is targeted by a cell cycle-specific modification that becomes apparent in late S phase and persists until mid-mitosis.

We next sought to determine if the cell cycle modification responsible for Xrs2 slow-migrating behavior during electrophoresis was phosphorylation. To achieve this, Xrs2 was immunoprecipitated from mitotic cells and the purified material was subjected to lambda phosphatase treatment. Figure 1D shows that this treatment converted the slow-migrating form of Xrs2 into a single species with high electrophoretic mobility. This experiment indicates that the cell cycle-dependent retardation of Xrs2 observed after electrophoresis was specifically due to phosphorylation.

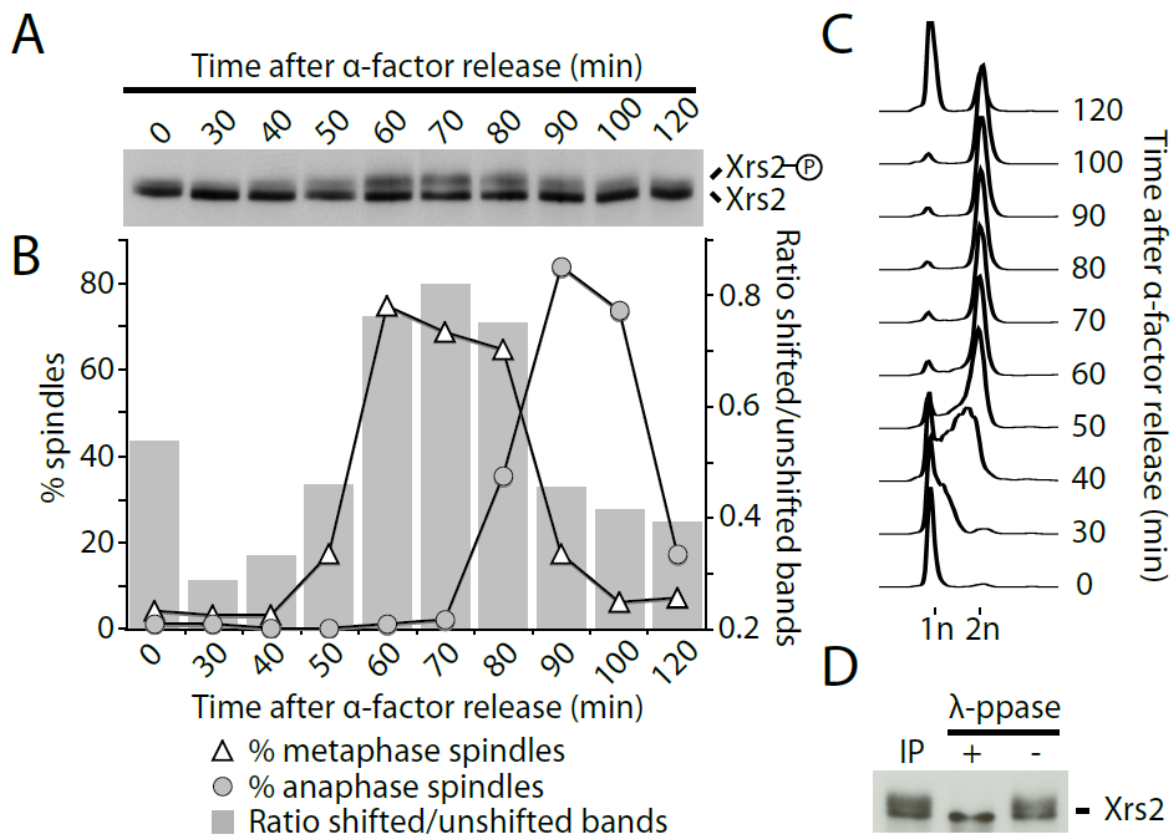


Figure 1. Phosphorylation of Xrs2 occurs in G2/M. (A, B) Yeast cells carrying HA-tagged Xrs2 were synchronized in G1 with alpha-factor and released synchronously throughout the cell cycle. Samples were taken at various times to examine Xrs2 protein migration by SDS-PAGE and western blot (A). Samples were also taken to monitor spindle formation (B) and DNA content by FACS (C). The graph in (B) also shows the relative ratios of intensity of shifted versus the unshifted bands of Xrs2 during the experiment. (D) Immunoprecipitated Xrs2 was subjected to dephosphorylation with lambda phosphatase (or mock treatment) prior to SDS-PAGE and western-blotting.

Cdk1 is an MRX kinase

We next wanted to identify the kinase responsible for the DNA damage-independent phosphorylation of Xrs2 during the cell cycle. Previous mass spectrometry analyses of the yeast phosphoproteome have identified phosphorylated residues in both Xrs2 and Mre11 that fit the minimal consensus for phosphorylation by Cdk1 [118, 122, 123]. Consistent with this, the timing of Xrs2 phosphorylation during the cell cycle correlates well with the window of maximal activation of yeast Cdc28/Cdk1 in G2/M phase [124]. These lines of evidence suggest that components of the MRX complex might be substrates for yeast Cdc28/Cdk1.

Examination of Xrs2 sequence revealed that there are a total of eight serines and threonines that conform to the minimal consensus for phosphorylation by Cdc28/Cdk1 (*i.e.*, Ser/ Thr-Pro; Fig. 2A-B). Among these, seven are localized in a specific region of Xrs2 that has a high tendency for structural disorder (Fig. 2A), a characteristic of surface-accessible residues [125]. We generated a mutant version of Xrs2 with 7 of its 8 putative Ser/Thr Cdk1 sites mutated to alanine residues (*i.e.*, *xrs2-7A*; Fig. 2B). The candidate Cdk1 site localized in the FHA domain of Xrs2 (Fig. 2A) was left unchanged to avoid inactivating FHA domain function. Next, we purified the phospho-mutant and wild-type versions of Xrs2 and tested whether they could act as substrates for Cdc28/Cdk1 *in vitro*. Figure 2C shows that incubation of wild-type Xrs2 with Cdc28-Clb2 and ATP resulted in quantitative phosphorylation of the substrate, as evidenced by the appearance of a new slow-migrating form of Xrs2 after electrophoresis. In striking contrast, the Xrs2-7A mutant protein was not modified by Cdc28-Clb2 under identical phosphorylation conditions (Fig. 2C).

The results of our *in vitro* experiments suggested that the Cdk1 consensus sites in Xrs2 are likely to be responsible for the cell cycle-dependent phosphorylation of this protein. To test this notion, we constructed a yeast strain carrying the *xrs2-7A* allele at its endogenous locus and compared Xrs2 phosphorylation in wild-type and mutant cells progressing synchronously in the cell cycle. Elimination of the 7 Cdk1 sites in Xrs2 prevented all detectable phosphorylation of this protein during the cell cycle (Fig. 2D). This phenotype is not due to differences in cell cycle progression since both the *XRS2* and *xrs2-7A* strains initiated S phase

and completed cytokinesis with similar kinetics (Fig. 2D; flow cytometry profile). These results strongly suggest that Cdc28 is the actual kinase that phosphorylates Xrs2 *in vivo*. If this were true, one would predict that forcing Cdc28 expression at a stage of the cell cycle when this kinase is not normally active would induce ectopic phosphorylation of its substrates, including Xrs2. To test this prediction, we co-expressed Cdc28 and the B-type cyclin Clb2 in yeast cells released from a G1 block into hydroxyurea (HU)-containing medium. This procedure induces an arrest in early S phase (Fig. 3E; see flow cytometry profiles), a stage of the cell cycle when Clb2-mediated Cdc28 activity is absent [126] and little Xrs2 phosphorylation is detected (Fig. 2E). Under these conditions, overexpression of Cdc28-Clb2 induced a noticeable shift in the electrophoretic mobility of wild-type Xrs2 (Fig. 2E; see 90 min time-point). In contrast, no change was observed in the electrophoretic behavior of Xrs2-7A under identical Cdc28-Clb2 overexpression conditions (Fig. 2E). Collectively, these results indicate that removal of the Cdk1 sites in Xrs2 renders the mutant protein resistant to ectopic phosphorylation by Cdk1 *in vitro* and *in vivo*.

Our identification of Xrs2 as a *bona fide* target of Cdc28/Cdk1 prompted us to investigate whether other members of the MRX complex might be targets of this kinase during the cell cycle. Mre11 is of particular interest in this respect because proteome-wide mass spectrometry analyses have identified a putative Cdc28/Cdk1 phosphorylation site on this protein [118, 122, 123, 125] and *mre11* mutants interact genetically with *cdc28* and *clb2* mutants [102, 127]. Furthermore, Mre11 holds six Ser/Thr-Pro consensus motifs for Cdc28 phosphorylation, all of which are located into a region of the protein that has a high probability for structural disorder (Fig. 3A-B). A previous analysis of yeast Cdc28/Cdk1 sites has revealed that a majority of *in vivo*-identified sites fall into regions of proteins that form loops or that are predicted to be structurally disordered [118]. In light of this, we asked whether Mre11 was a direct substrate for Cdc28/Cdk1. Figure 3C shows that incubation of purified Cdc28 with Mre11 caused an ATP-dependent shift in Mre11 electrophoretic migration, consistent with the notion that this protein is being quantitatively modified during the kinase reaction. Moreover, removal of all putative Cdk1 sites in the Mre11-6A mutant rendered the protein insensitive to Cdc28-dependent phosphorylation (Fig. 3C). This experiment indicates that the Cdk1

consensus sites were responsible for the reduced electrophoretic mobility of Mre11 protein following phosphorylation.

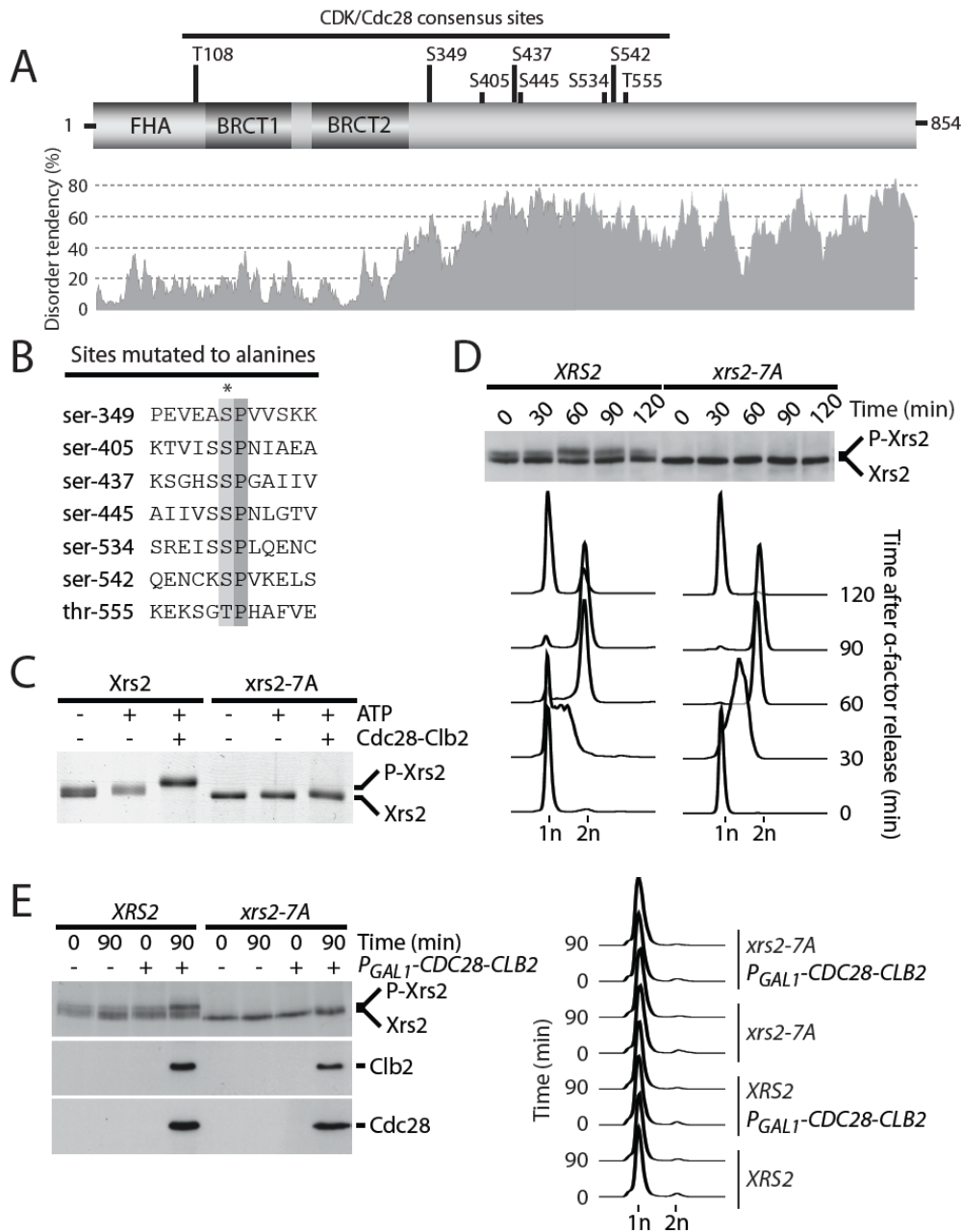


Figure 2 (légende sur page 35)

Figure 2. Xrs2 is phosphorylated by Cdc28 *in vivo* and *in vitro*. (A) Schematic representation of Xrs2 and distribution of consensus Cdc28 Ser/Thr-Pro sites within the protein primary amino-acid sequence. The predicted disorder of the protein (calculated by IUPred) [128] is shown under the schematic. (B) Alignment of the 7 Cdc28-consensus sites found in the middle of Xrs2. The asterisk symbol indicates residues mutated to alanine. (C) Purified Xrs2 and Xrs2-7A proteins were phosphorylated *in vitro* using Cdc28-Clb2. Reaction mixtures were subsequently analyzed by SDS-PAGE and Coomassie staining. (D) Wild-type and *xrs2-7A* cultures were released from a G1 arrest and samples were taken at indicated time points. FACS DNA content profile shows that cell-cycle progression was similar in wild-type and mutant *xrs2*. (E) Cells containing pGAL1-10-Cdc28-Clb2 or an empty plasmid were synchronized in G1 and released in hydroxyurea to block cells in early S phase. Cdc28-Clb2 was overexpressed in *XRS2* and *xrs2-7A* by addition of galactose. Cells remain in G1 or early S phase for the duration of the experiment, as judged by DNA content.

We next asked whether Mre11 was phosphorylated *in vivo* and if the timing of this event was following the same cell cycle parameters as those of Xrs2 phosphorylation. Analysis of Mre11 phosphorylation by electrophoresis in Phos-tag-containing acrylamide [129] revealed that the protein migrates as two distinct bands irrespective of cell cycle stage (Fig. 3D). Lambda phosphatase treatment of immunoprecipitated materials confirmed that protein phosphorylation was responsible for the formation of the slower-migrating species of Mre11 (Fig. 3E). Importantly, removal of the 6 putative Cdk1 sites in the *mre11-6A* mutant prevented the appearance of the slow migrating species of Mre11, while cell cycle progression remained essentially unaffected in the mutant strain (Fig. 3D). Taken together with our *in vitro* kinase experiment, this result indicates that the Cdk1 consensus sites in Mre11 are targeted by phosphorylation *in vivo*. The cell cycle independence of this process may indicate that Mre11 is targeted by both G1- and B-type CDKs, as previously shown for Abp1 [130], or alternatively, that another proline-directed kinase phosphorylates Mre11.

Since MRX complex subunits are genetically epistatic and biochemically interdependent [3], we wondered whether the phosphorylation status of one subunit could affect that of another subunit. To test this notion, we evaluated Xrs2 electrophoretic mobility throughout the cell

cycle in an *mre11-6A* mutant background, as well as in a phospho-mimetic *mre11-6E* background. While the cell cycle remained unchanged in all backgrounds, we could not detect any difference in the timing and extent of Xrs2 phosphorylation in phospho-deficient and phospho-mimetic mutants of Mre11 (Fig. S1A). Conversely, Mre11 phosphorylation level was not altered in *xrs2-7A* and *xrs2-7E* backgrounds compared to wild-type cells (Fig. S1B). Taken together, our results indicate that Xrs2 and Mre11 are phosphorylated independently of each other and following differing cell cycle kinetics.

Figure 3. Mre11 is a substrate for phosphorylation by Cdc28. (A) Schematic representation of Mre11 and distribution of consensus Cdc28 Ser/Thr-Pro sites within the protein primary amino-acid sequence. The predicted disorder of the protein (calculated by IUPred) is shown under the schematic. (B) Alignment of putative Cdc28 phosphorylation sites found in Mre11. The asterisk symbol indicates residues mutated to alanine. (C) Purified Mre11 and Mre11-6A proteins were phosphorylated in vitro using Cdc28-Clb2. Reaction mixtures were subsequently analyzed by SDS-PAGE and Coomassie staining. (D) Samples from MRE11-MYC and *mre11-6A*-MYC cultures were taken at indicated time points after release from a G1 block and subjected to SDS-PAGE analysis. DNA content determined by FACS shows that cell cycle progression was similar in wild-type and *mre11-6A* cultures. (E) Immunoprecipitated Mre11 was dephosphorylated with lambda phosphatase (or mock treated) prior to SDS-PAGE and western-blot analysis.

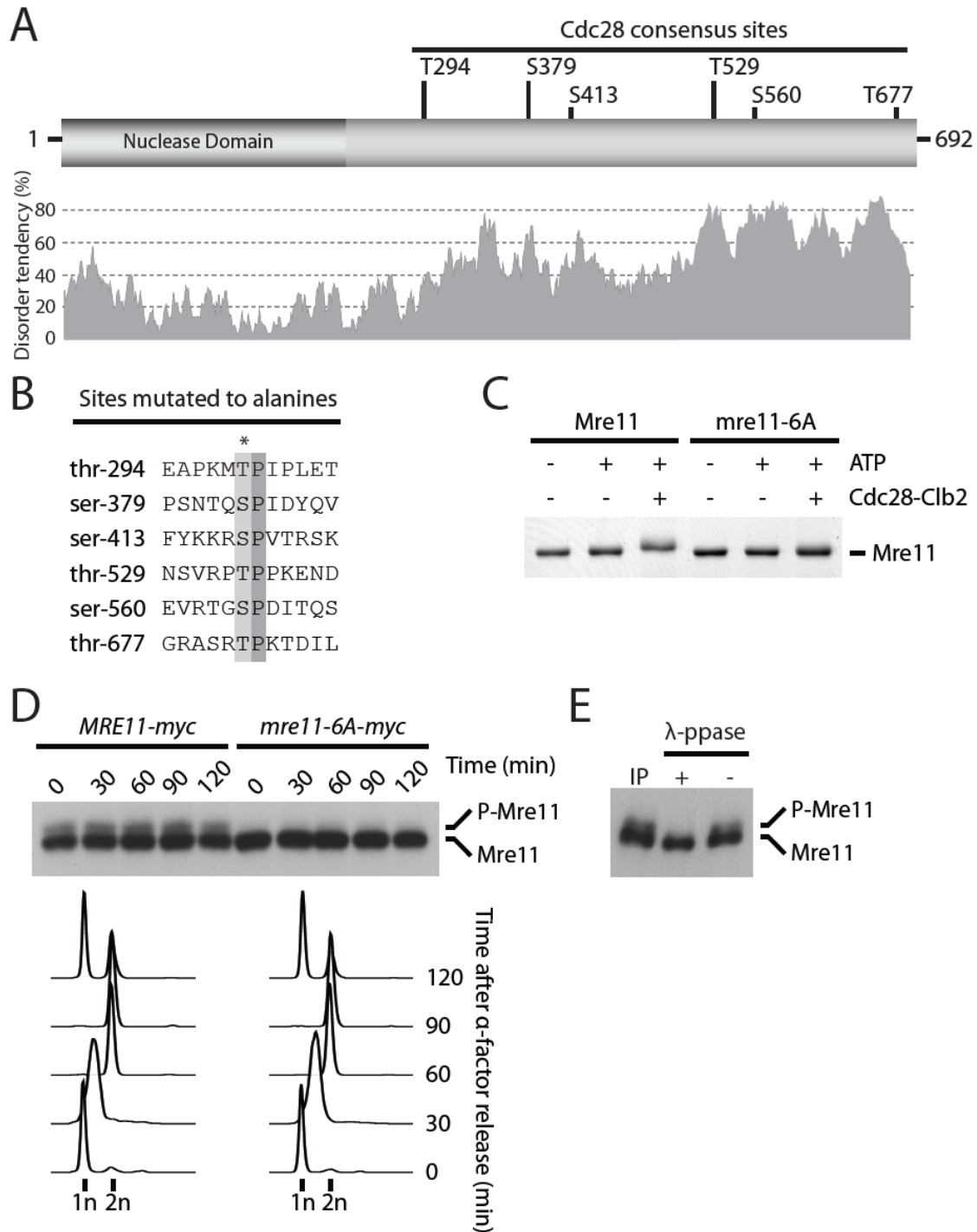


Figure 3 (légende sur page 36)

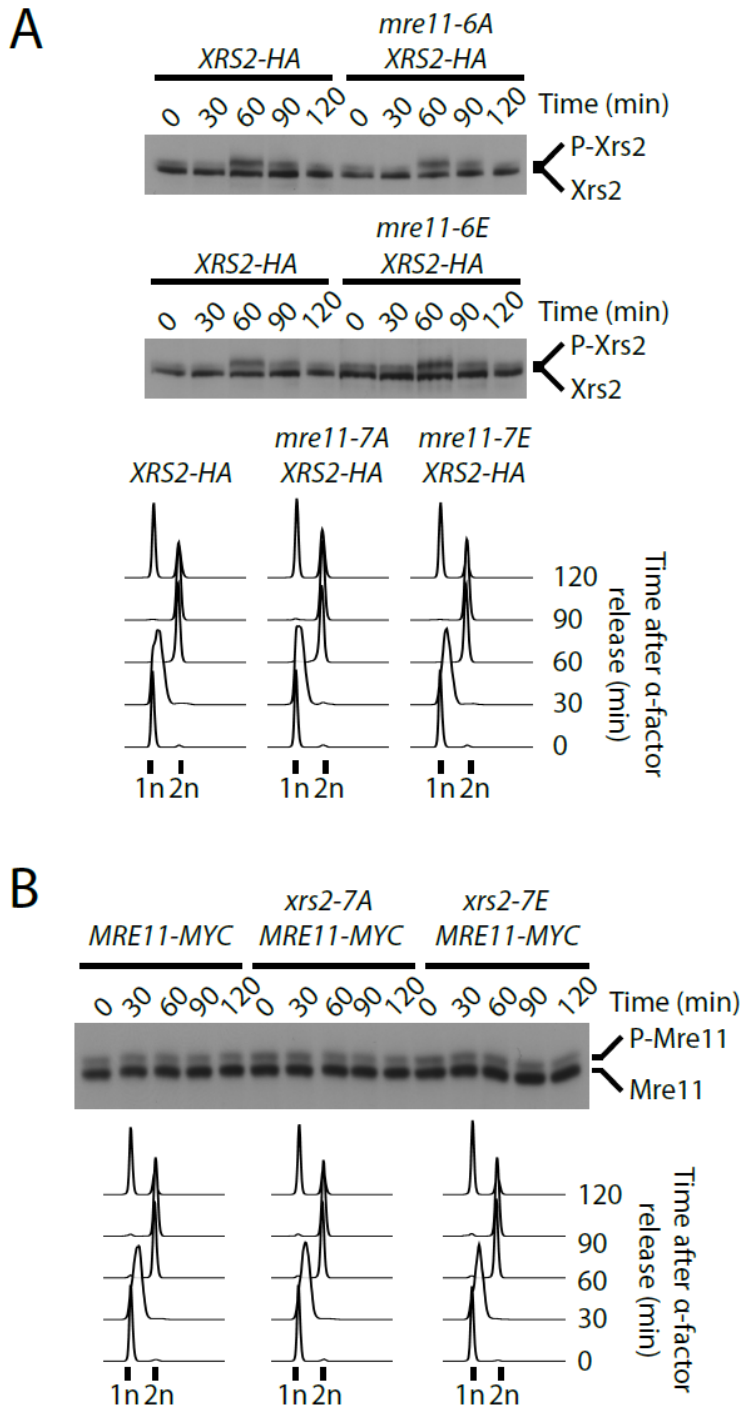


Figure S1. Cdc28 phosphorylation events on Mre11 and Xrs2 are independent (A-B) Yeast cells were synchronized in G1 with alpha-factor and released synchronously into the cell cycle. The electrophoretic mobility of Xrs2 in combination with *MRE11*, *mre11-6A* and *mre11-6E* alleles (A) or that of Mre11 in combination with *XRS2*, *xrs2-7A* and *xrs2-7E* alleles (B) was analyzed by SDS-PAGE and western-blotting. FACS DNA content profiles show that cell cycle progression was similar in all yeast strains.

The DNA damage- and cell cycle-specific phosphorylation of MRX are independent events

The identification of Cdc28/Cdk1 as a novel Xrs2/Mre11 kinase uncovers an unexpected mode of regulation of the MRX complex that is independent of the presence of exogenous DNA damage. However, some of the mitotic Cdk1 sites that we identified on MRX components were also identified in large-scale mass spectrometry analyzes of cells treated with DNA damaging agents (namely, Ser349, Ser445, and Ser534 on Xrs2 and Ser560 on Mre11 [118, 122, 123]). We confirmed this observation using targeted mass spectrometry analysis of Xrs2 isolated from damaged cells (Fig. S2). These data hint at the possibility that Cdk1 sites on Xrs2 and potentially Mre11 might be phosphorylated under two distinct conditions: in response to DNA damage and during an undamaged cell cycle. Alternatively, at least in the case of Xrs2, the phosphorylation on mitotic sites during the DNA damage response could be an indirect consequence of checkpoint-induced arrest in G2/M [131], a stage of the cell cycle with elevated Cdk1 activity [124].

To discriminate between these possibilities, we decided to investigate the impact of losing Cdk1 sites on the DNA damage-induced phosphorylation of Xrs2. Cultures of asynchronous cells were exposed to three different genotoxic agents, namely, 4-nitroquinoline 1-oxide (4-NQO), zeocin and methyl methanesulfonate (MMS), which collectively represent a wide spectrum of possible DNA lesions. As a control for DNA damage induction, we monitored the activation of Rad53 checkpoint kinase using an *in situ* activity (ISA) assay [132]. In agreement with previous studies [9, 58], wild-type Xrs2 experienced a large phosphorylation-induced electrophoretic shift following induction of DNA damage, with a state of maximal phosphorylation being reached 60 minutes following addition of the genotoxic agents (Fig. 4B-D). Interestingly, the Cdk1 site mutant of Xrs2 also experienced a quantitative retardation in electrophoretic mobility following DNA damage exposure, although one of reduced magnitude compared to that of the wild-type protein (Fig. 4B-D). This result suggests that Xrs2 Cdk1 phospho-sites are not critical targets of the DNA damage response, although they are necessary to achieve maximal phosphorylation of the protein after treatment with DNA-damaging agents. This interpretation is consistent with the fact that Mre11 and Xrs2 are known substrates for Tel1 and Mec1 kinases during the DNA damage response [9,

58], and both proteins contain several serine/threonine-glutamine (Ser/Thr-Gln) consensus motifs that are preferred targets for this family of kinases [63]. We next wanted to determine the contribution of Tel1/Mec1 on the DNA damage-dependent phosphorylation of Xrs2. To this end, we generated a mutant of Xrs2 having lost its 4 serines/threonines highly susceptible to Tel1/Mec1 phosphorylation (*i.e.*, *xrs2-4A*; Fig. 4A) and evaluated the phosphorylation of the resulting mutant after DNA damage. Compared to wild-type Xrs2, the electrophoretic mobility shift observed with Xrs2-4A protein following DNA damage was only marginally affected by the loss of Tel1/Mec1 consensus sites (Fig. 4B-D). Moreover, combining the Cdk1 and Tel1/Mec1 mutations from both *xrs2-7A* and *xrs2-4A* alleles (to generate an *xrs2-11A* allele; Fig. 4A) did not reduce Xrs2 phosphorylation below the level observed in the *xrs2-7A* mutant (Fig. 4B-D; last three lanes for 4-NQO and zeocin). Together, these results indicate that the optimal Cdk1 and Tel1/Mec1 motifs are not the only sites that are phosphorylated in Xrs2 during the cellular response to DNA damage.

The results described above may at first appear paradoxical with the observation that loss of Tel1 and Mec1 activity eliminates all detectable DNA damage-dependent phosphorylation of Xrs2 [9, 58]. However, this observation can be readily explained by the fact that members of the ATM family of kinases are able to phosphorylate residues outside their preferred consensus motif, including serines/threonines followed by prolines, aspartates, glycines and glutamates [133-137]. This suggested that the DNA damage-dependent phosphorylation that remained in the Xrs2-11A mutant might be due to phosphorylation of non-consensus sites by Tel1/Mec1. To test this hypothesis, we created a mutant that has lost most of its serines that are followed by aspartate, glycine, proline, and glutamate, in addition to the optimal Tel1/Mec1 consensus sites (*i.e.*, *xrs2-27A*; Fig. 4A). We focused on serine phosphorylation for this specific mutant because ATM-like kinases are known to favor serine over threonine in phosphorylation reactions [135]. Putative phospho-sites that are located in the FHA domain of Xrs2 were not mutated in order to prevent indirect loss of phosphorylation due to FHA domain inactivation. Examination of the electrophoretic behavior of Xrs2-27A revealed that phosphorylation of this mutant protein was severely reduced in cells exposed to genotoxic agents (Fig. 4E; 30 and 60 min time-points). Indeed, we could not detect any gel shift of Xrs2-27A mutant in cells treated with 4-NQO or MMS, whereas only a slight upward

smear was detected after zeocin treatment (Fig. 4E). Altogether, this analysis reveals that residues that do not fit Tel1/Mec1 optimal target motif contribute significantly to the DNA damage-induced phosphorylation of Xrs2.

We next wanted to determine whether the phosphorylation of Mre11 was regulated in a similar fashion to that of Xrs2 following genotoxic stress. As described above, Mre11 migrated as two distinct electrophoretic species under basal condition; a non-modified species and the previously described isoform phosphorylated on Cdk1 consensus sites (hereafter referred to as Mre11-P^C). However, following exposure to DNA damage, a novel slow-migrating phospho-species of Mre11 appeared on gel (Mre11-P^D; Fig. 4G), consistent with previous reports that Mre11 becomes hyperphosphorylated in response to genotoxic stress [9, 58]. Importantly, elimination of the Cdk1 phospho-sites in the Mre11-6A protein did not affect its DNA damage-dependent phosphorylation. Specifically, the Mre11-P^D isoform persisted at the same position and same signal intensity in *mre11-6A* mutant and wild-type cells treated with DNA-damaging agents, in contrast to the Mre11-P^C isoform, which disappeared upon removal of Cdk1 sites (Fig. 4G).

Although the experiments described above appear to exclude a role for Cdk1 activity in the DNA damage-induced phosphorylation of Xrs2 and Mre11, it remains a formal possibility that Cdk1 phosphorylation could affect this process through indirect means. To address this, we investigated whether the DNA damage-specific modification of Xrs2 and Mre11 could still be induced in the total absence of mitotic Cdk1 activity. To achieve this, we blocked cells in G1 to prevent mitotic Cdk1 activation, and exposed them to either zeocin or 4-NQO. Under these conditions, we observed normal DNA damage-induced phosphorylation of both Xrs2 and Mre11 30 and 60 minutes following treatment (Fig. 4F,H). This result shows that the DNA damage-dependent phosphorylation of Xrs2 and Mre11 does not require cell cycle progression nor mitotic Cdk1 activity. Collectively, the lines of evidence presented herein are consistent with the existence of two regulatory systems acting independently of each other to phosphorylate components of the MRX complex in response to DNA damage and during mitosis. It is important to mention that during these experiments, we did not detect any deficiency in the DNA damage-dependent activation of Rad53 kinase in *xrs2* or *mre11*

phospho-mutants (see Rad53 ISA in Fig. 4B-G), thereby suggesting that phosphorylation of these proteins does not regulate checkpoint activation *in vivo*.

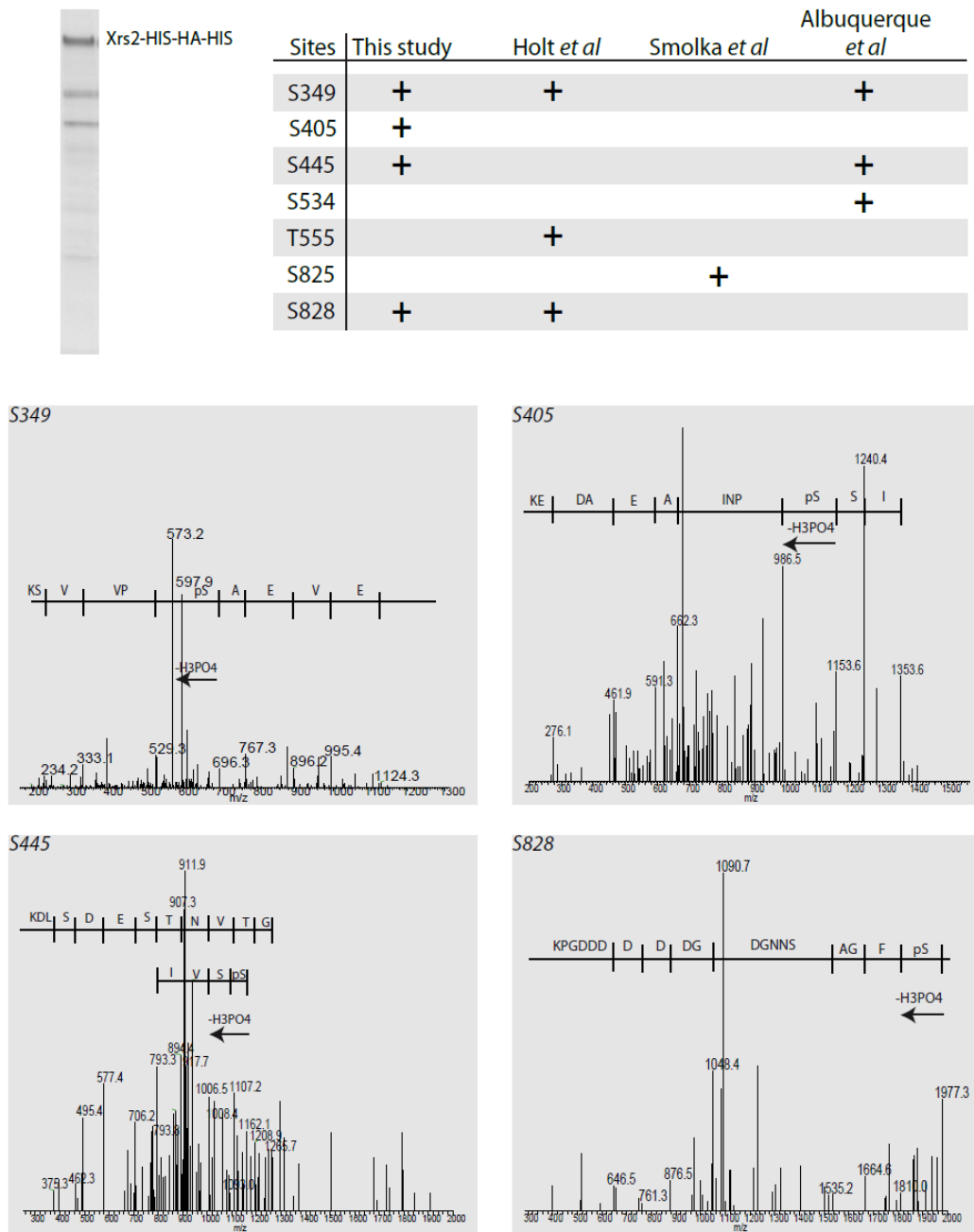


Figure S2 (légende sur page 44)

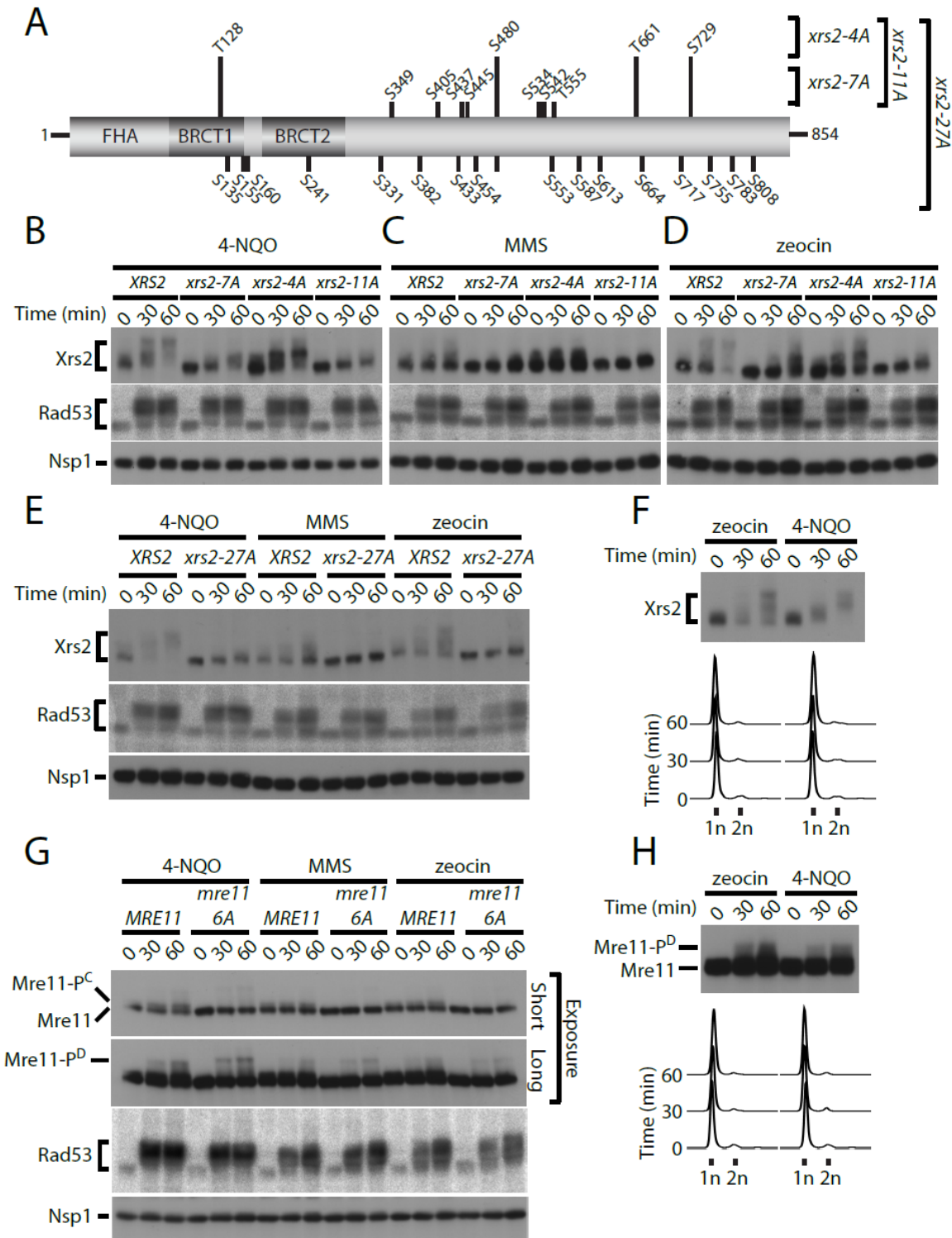


Figure 4 (légende sur page 44) **f DNA damage induced phosphorylation of Xrs2**

A culture of cells expressing *Xrs2-12xHIS-HA* under the control of the *GAL1* promoter was treated with 25 μ M 4-NQO for 2 hours. *Xrs2* was purified from yeast extracts by nickel-chelate

chromatography and the purified material was subjected to mass spectrometry analysis to identify phosphorylated peptides. The spectra of phosphorylated peptides are shown and the identified phospho-sites are compared to previous mass spectrometry findings.

Figure 4. DNA damage-dependent phosphorylation of Xrs2 and Mre11 mutants *(A) Schematic representation of the mutations introduced in the relevant XRS2 phospho-mutants. (B-E) Cultures of asynchronous log-phase cells carrying HA-tagged Xrs2 were treated with either 25 μ M 4-NQO, 0.02% MMS or 100 μ g/mL zeocin. Samples were taken at indicated time points following addition of the genotoxic drugs and Xrs2 mobility was determined by western blot analysis. Checkpoint-dependent activation of Rad53 was monitored in parallel using an in situ assay (ISA). (F) Cells expressing HA-tagged Xrs2 were blocked in G1 with alpha-factor prior to being treated with 100 μ g/mL zeocin or 25 μ M 4-NQO. DNA content profiles of the arrested cultures are shown under the gel. (G) Cells carrying MYC-tagged Mre11 were treated as in panel (B) to monitor phosphorylation-induced changes in electrophoretic mobility. (H) Cells carrying MYC-tagged Mre11 were treated as in panel (F) to monitor G1-specific DNA damage-induced phosphorylation.*

DSB resection and HR are not defective in phospho-deficient mutants of the MRX complex

We next wanted to determine the biological significance of the cell cycle-dependent phosphorylation of the MRX complex. Previous studies have implicated Cdk1/Cdc28 as an important regulator of the DNA damage response [99, 138]. In particular, Cdk1 activity is known to promote repair of DSBs through the HR pathway, with one of the key substrate being the Mre11-interacting protein Sae2/CtIP [105]. Taking this into consideration, it seemed likely that phosphorylation of Mre11 and Xrs2 by Cdk1 would influence HR repair of DSBs. However, we performed several independent experiments that argue against a role for Xrs2 and Mre11 phosphorylation in HR repair in budding yeast. For instance, processes that are heavily reliant on effective HR, such as resistance to chronic doses of DNA damage or execution of meiosis, were not detectably affected by phospho-deficient or phosphomimetic alleles of *XRS2* and/or *MRE11* (Figs. 5A,B and S3A). The absence of defects in those assays was not the result of functional redundancy between the phosphorylation of Mre11 complex components and that of Sae2/CtIP because combination of *xrs2-7A* and *mre11-6A* alleles with an *SAE2* deletion did not give rise to enhanced DNA damage sensitivity in the double mutants (relative to *sae2Δ* single mutant; Fig. 5C). Moreover, analysis of DSB resection at the HO locus [69] indicated that Cdk1 phosphorylation of Xrs2 and Mre11 does not detectably affect the formation of single-strand DNA at damaged sites (Fig. 4D). Finally, epistatic analysis revealed that *xrs2-7A mre11-6A* mutations did not exacerbate the resection phenotype of strains lacking Exo1 or Sgs1, two key regulators of DSB end processing (Fig. S3B-C) [69, 71, 106]. Collectively, these results lead to the conclusion that phosphorylation of the MRX complex by Cdk1 is not essential for HR in mitosis and meiosis.

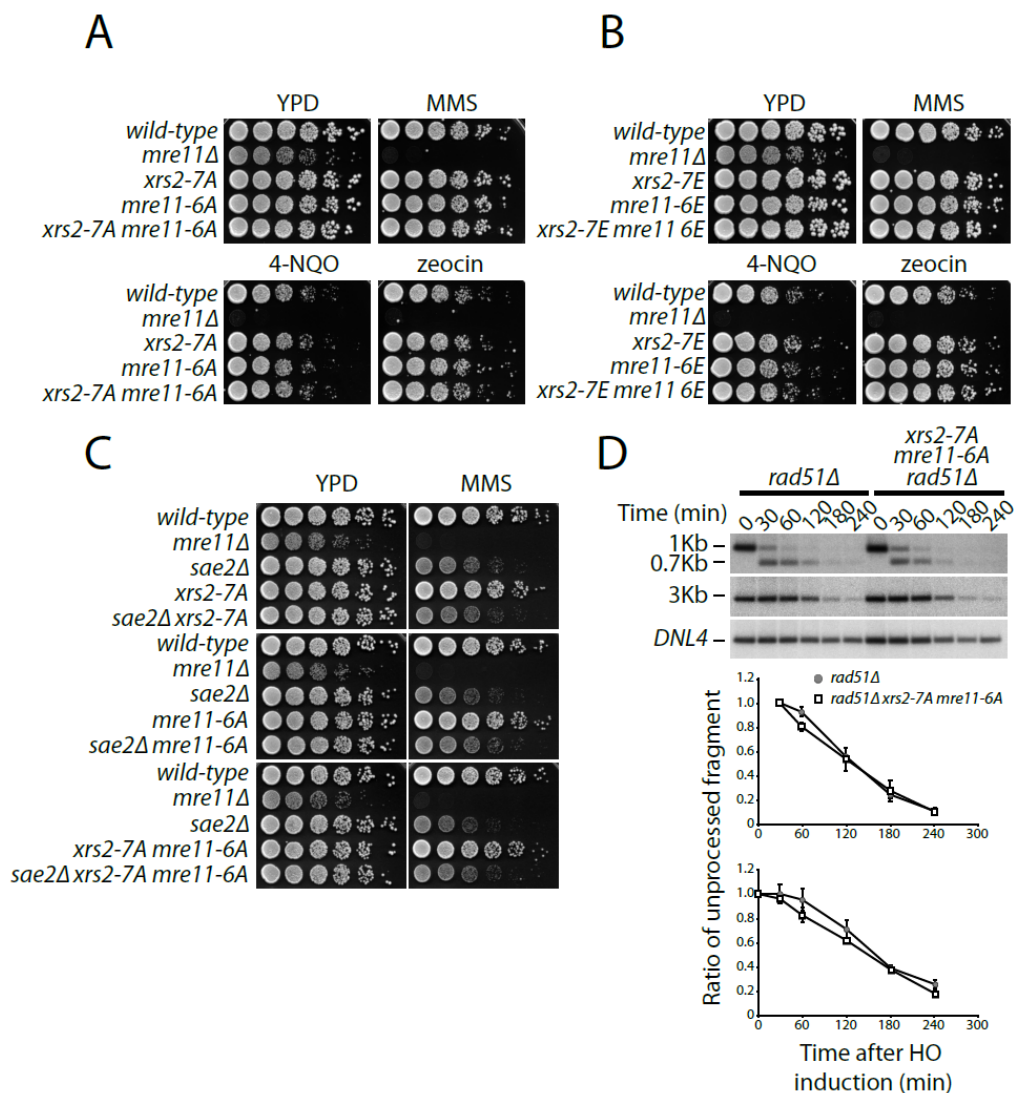


Figure 5. Cdc28 phosphorylation of the MRX complex is not required for HR. Five-fold serial dilutions of relevant yeast strains grown on solid YPD medium containing no drugs, 0.005% MMS, 0.250 μ M 4-NQO or 5 μ g/mL zeocin. (C) Genetic analysis of the DNA damage sensitivity of *sae2Δ* and Cdk1-mutants of *Mre11* and *Xrs2*. (D) DNA end resection of an HO-induced DSB at the *MAT* locus was monitored by Southern blot analysis, as previously described. Resection of the DSB was measured by following the disappearance of the 0.7kb and 3kb bands by densitometry. Graphics represent the signal ratio of the resected band over that of the loading control band. Top graph corresponds to the signal ratio of the 0.7 kb fragment using T30 as control, while the bottom graph corresponds to the signal ratio of the 3 kb fragment using T0 as control. Data are presented as the mean of 3 independent experiments \pm SEM.

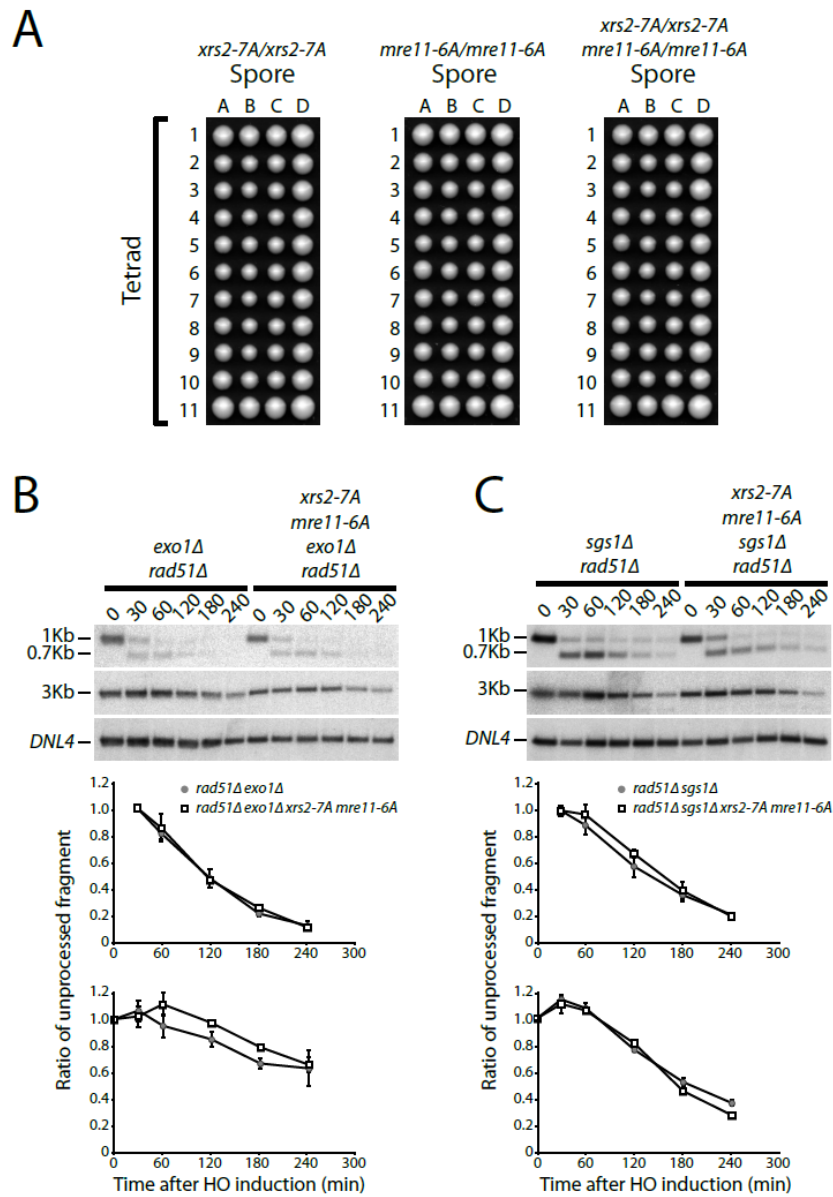


Figure S3. Phenotypes of MRX phosphomutants in HR-dependent processes (A) Diploid cells of the relevant genotypes were induced to undergo meiosis by starvation. Eleven tetrads were dissected for each genotype and the resulting spores were allowed to grow for a period of 3 days on rich medium. (B, C) Resection assays were performed as described in Figure 5 in *exo1Δ* (B) or *sgs1Δ* (C) mutant strains.

Xrs2 and Mre11 phosphorylation regulates DSB repair by NHEJ

The fact that loss of both cell cycle- and DNA damage-dependent phosphorylation in Xrs2 did not enhance sensitivity to genotoxic stress or affect telomere length (*i.e.*, see *xrs2-7A* in Fig. 5A and *xrs2-27A* in Fig. 6A,B) indicates that cellular processes other than HR are likely to be affected by loss of MRX complex phosphorylation. In this context, a critically important cellular process that could be regulated by Cdk1 phosphorylation of Xrs2 and Mre11 is NHEJ. Indeed, the Mre11 complex is a known regulator of NHEJ in several eukaryotes [3]. Moreover, since the relative use of NHEJ is reduced during DSB repair in the late stages of the cell cycle [99, 138], and this reduction correlates with the period of maximal Cdk1 phosphorylation of Xrs2, we reasoned that there might be a functional connection between these two events.

To test this hypothesis, we evaluated the NHEJ efficiency of mutant cells by measuring their ability to repair a linearized plasmid *in vivo*. To do so, a URA3 marker-containing plasmid digested with either a 5' or 3' overhang generating enzyme was transformed in yeast. Cells that successfully repair the plasmid through NHEJ are able to replicate it and can be selected for on media lacking uracil. Importantly, we used *rad51Δ* backgrounds to prevent homologous recombination-based genomic integration of the URA3 marker. This allowed the measurement of NHEJ efficiency by the relative number of colonies growing on media lacking uracil in mutants versus control conditions. Remarkably, this assay revealed that NHEJ efficiency was increased 30 to 40% over control in *xrs2-7A mre11-6A* phospho-mutants (Fig. 6C). This observation was true irrespective of the nature of the overhangs used in repair templates (compare 5' and 3' overhang substrates in Fig. 6C). Moreover, *xrs2-7E mre11-6E* phospho-mimetic mutants displayed the exact opposite phenotype in end-joining assays. Indeed, we observed that NHEJ was reduced by 40% relative to control in the *xrs2-7E mre11-6E* mutant (Fig. 6C). The reciprocal nature of the results observed in NHEJ assays with the phospho-mimetic and phospho-mutant alleles of *XRS2* and *MRE11*, combined with the normal behavior of these alleles in other assays, argue strongly for a specific inhibitory role of Cdk1 phosphorylation in the NHEJ process. We next tested the NHEJ efficiency of the *xrs2-27A* mutant, a variant that is fully resistant to DNA damage-induced phosphorylation (Fig. 4E). Interestingly, rejoining of both 5' and 3' overhang substrates is downregulated by about 50% in

xrs2-27A mutants compared to controls (Fig. 6D). Taken together, our results show that phosphorylation of the MRX complex on Cdk1 consensus sites reduces the efficiency of DSB repair by NHEJ, while Tel1/Mec1-mediated modifications are necessary for effective NHEJ during the DNA damage response.

The results described above may explain why MRX phospho-mutants did not show DNA damage sensitivity in previous assays (Figs. 5A-C, and 6A). Indeed, under normal circumstances in yeast, the physiological contribution of NHEJ to DSB repair is modest relative to HR and can be revealed only with very high or acute doses of DNA damaging agents [82, 139, 140]. Consistent with this, our previous DNA damage sensitivity assays were performed under conditions of chronic exposure to genotoxic drugs, a setting that necessitates the use of mild/moderate doses of DNA-damaging agents to allow for cellular growth. Therefore, we asked whether the NHEJ defect of MRX phospho-mutants diminished the ability of cells to resist acute DNA damage. To achieve this, we overexpressed the I-PpoI enzyme in yeast, a meganuclease that recognizes a 15 bp site repeated ~100 times in the ribosomal DNA (rDNA) array on yeast chromosome 12 [141]. This level of damage represents a heavy burden on DSB repair pathways and it is expected that any defect in DSB repair pathways would result in loss of viability under such severe stress. As expected, even a short pulse of expression (2h) of I-PpoI using the inducible *GALI0-1* promoter reduced the viability of wild-type cells to 65% of that of non-induced controls (Fig. 6E). Interestingly, upon expression of I-PpoI, the viability of *xrs2-7A mre11-6A* mutants diminished significantly below that of wild-type cells, to about 43% of non-induced controls ($P < 0.05$; Fig. 6E). Loss of all DNA damage phosphorylation in *xrs2-27A* mutants resulted in a similar hypersensitivity to I-PpoI expression relative to wild-type or non-induced cells (*i.e.*, 45% viability; Fig. 6E). Oddly, opposite effects on NHEJ efficiency of *xrs2-7A mre11-6A* and *xrs2-27A* mutants result in a similar viability following I-PpoI treatment. These results hint at the possibility that at least in the case of *xrs2-7A mre11-6A* mutant, overactivation of NHEJ could hinder homologous recombination in a way that was not detectable in our previous experimental setup. Nonetheless, collectively these results demonstrate the biological relevance of MRX phosphorylation for effective NHEJ and cellular resistance to DNA damage.

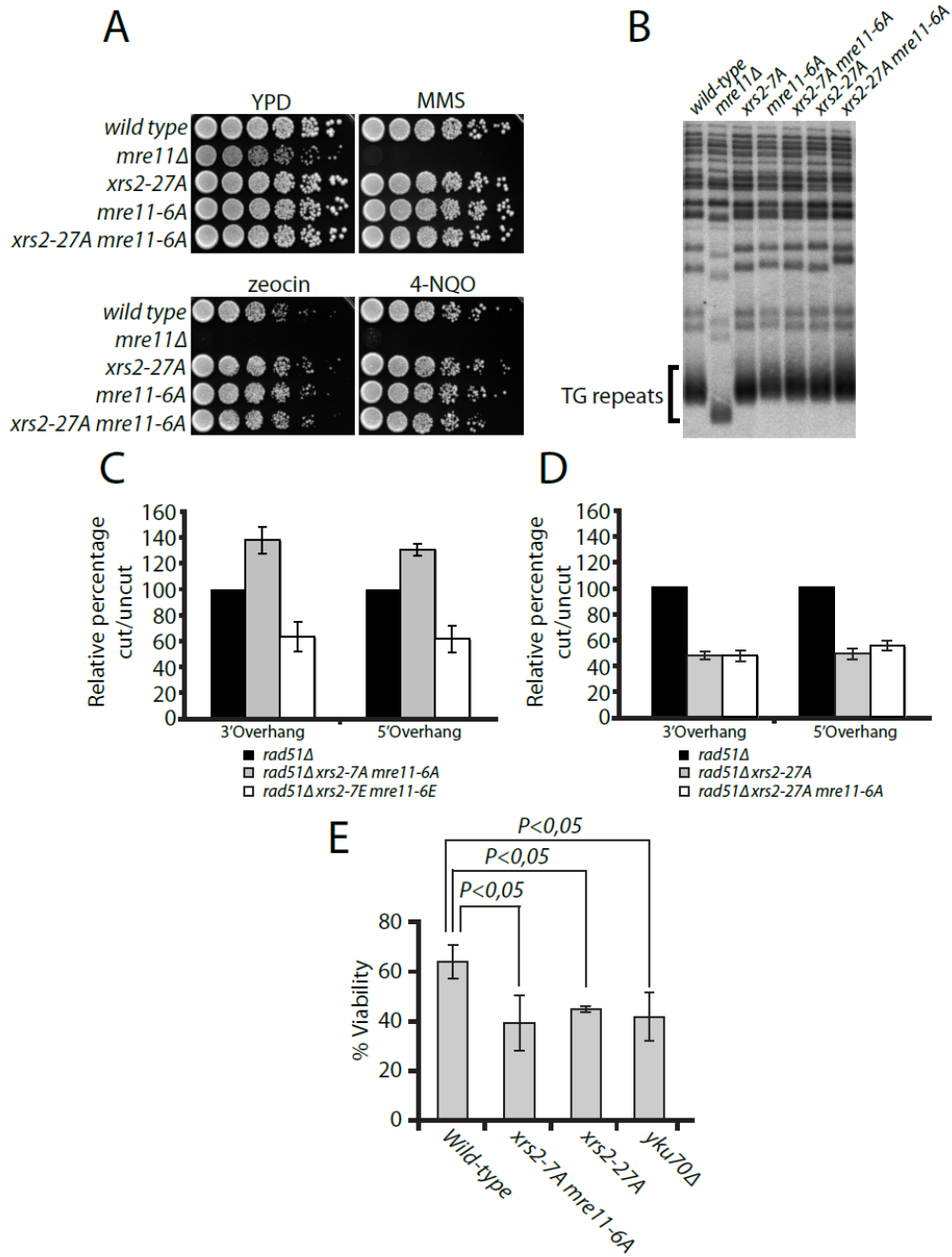


Figure 6

Figure 6. Roles of Cdk1- and DNA damage-dependent phosphorylation of the MRX complex (A) Five-fold serial dilutions of the relevant yeast strains were grown on YPD medium containing no drug, 0.005% MMS, 0.250 μ M 4-NQO, or 5 μ g/mL zeocin. (B) Telomere length was determined in various yeast mutants using southern blotting with a probe against the TG repeats of telomeres. (C-D) NHEJ efficiency in *mre11* and *xrs2* phosphomutants. The relative efficiency of rejoining of *SphI* (3'overhang) or *XmaI* (5' overhang)-digested plasmids was determined in *mrX* phosphomutants deficient in *Rad51* activity. The NHEJ efficiency of wild-type yeast was set arbitrarily to 100%. The mean of 3-4 independent experiments is shown \pm SEM. (E) Survival to an acute dose of DNA damage at the *rDNA* locus. *I-PpoI* expression was induced for two hours by addition of 2% galactose to exponentially-growing cell. Cellular viability is expressed as the ratio of the number of colony forming units obtained prior to, and after *I-PpoI* induction, multiplied by 100. Values shown represent the average of three independent experiments performed with 2 separate clones for each genotype. The error bars reflect SEM. *P*-value was calculated using a two-tailed unpaired student *t* test, and * signifies *P* value <0.05.

DISCUSSION

The MRX complex is a critical component of the DNA damage response, having essential roles in checkpoint signaling and repair of DSBs through HR as well as NHEJ [3, 80]. The multifaceted involvement of the MRX complex in the DDR is a likely consequence of its ability to act as an early sensor of the presence of DSBs within the genome. As such, the MRX complex sits at a unique position in the DDR to influence, and possibly regulate, the efficiency and type of repair pathway cells use to respond to genotoxic stress. Consequent with this view, our findings reveal the existence of two independent systems that act on Xrs2 and Mre11 to regulate its function in NHEJ-mediated repair of DSBs. We show here that components of the MRX complex are subject to CDK-mediated cell cycle phosphorylation and ATM/Tel1-mediated phosphorylation in response to DNA damage. Remarkably, abrogation of these two phospho-regulatory events has antagonistic effects on the efficiency of DSB repair by NHEJ. The impact of phosphorylation on MRX components is highly specific since no other process promoted by this complex are detectably affected in cells expressing MRX phospho-mutants. Collectively, our results implicate CDK/Cdc28- and ATM/Tel1-mediated phosphorylation as key determinants of the efficiency of DSB repair by NHEJ.

It has been firmly established over the last several years that NHEJ and HR –two pathways competing for the repair of DSBs– are preferentially used in different stages of the cell cycle (reviewed in [98, 99]). Furthermore, it has been argued that the choice for using a specific pathway over the other is primarily made at the level of DSB resection, a process promoted by CDK phosphorylation (reviewed in [98, 99]). The rationale supporting this view is compelling because the increase in CDK activity that accompanies cell cycle progression is temporally connected with the appearance of sister-chromatids, the optimal template for effective HR. Furthermore, CDK has the ability to specifically phosphorylate several HR factors, most notably CtIP/Sae2, thus promoting 5'-to-3' resection of DSBs and HR [105, 108]. The cell cycle-regulated abundance of CtIP/Ctp1 –which peaks simultaneously with B-type CDK activity– may also play an important role in the promotion of DNA end resection [116, 117]. Ultimately, resection of DSB is known to inhibit NHEJ, and it is generally thought that activation of the resection process acts as a switch that favors HR-based repair of DSBs at the expense of NHEJ in late S, G2, and M phase of the cell cycle. A key question with respect to

this model is whether the preferential choice for HR-based repair of DSB in S/G2/M can be fully explained by a passive competition process from NHEJ's perspective, or by a direct negative regulation of the NHEJ process in the presence of high CDK levels. Indeed, previous studies have shown that the NHEJ pathway is active throughout the cell cycle, acts prior to the initiation of HR [142], and can inhibit HR in a dominant manner via Ku-mediated end-binding [114]. These facts, together with additional evidences [143, 144] argue that increased HR activity may not be sufficient alone to explain pathway preference for DSB repair in S/G2/M phases. Our data provide critical insight on this issue by demonstrating that the choice of DSB repair pathway is also governed by direct inhibition of NHEJ. Indeed, we show that CDK-mediated phosphorylation of the MRX complex reduces the ability of cells to perform NHEJ *in vivo*. Removal of CDK consensus sites in MRX complex components increases significantly the efficiency of plasmid-based NHEJ, whereas introducing phospho-mimetic mutations causes a corresponding decrease in DSB repair. This reciprocal relationship, together with the absence of detectable defects when assessing phospho-mutants for other MRX-specific phenotypes, strongly suggests that the effects of CDK phosphorylation on the MRX complex are specific. Taken together, our findings unravel a novel mechanism that underpins pathway preference for DNA repair during the cell cycle.

The fact that MRX complex is the target for this mechanism is consistent with the observations that the complex plays a very early role in the DDR [145] and that it regulates both NHEJ and HR repair pathways [3]. Interestingly, multiple lines of evidences suggest that the mechanisms unraveled herein are conserved evolutionarily. Indeed, it was recently reported that human Mre11 interacts directly with CDK2 (an homolog of yeast Cdc28; [146]), thus making the complex a likely target for CDK phosphorylation in mammals. Moreover, another study recently showed that human Nbs1, the functional homolog Xrs2, is phosphorylated directly by CDK1 on Ser432 [120, 121]. The authors of those studies showed that removal of the phospho-site affected the ability of cells to survive DNA damage, although the effects of Nbs1 phosphomutant on DNA-end resection and HR efficiency are not the same in both reports. Although we did not detect any defect in DSB resection or HR efficiency in our mutants, we note that removal of the Ser432 in human Nbs1 resulted in an apparent increase in NHEJ efficiency relative to control cells (observation not highlighted in [120] but

shown Fig. 3D therein). This observation is reminiscent of the NHEJ phenotype seen in our *xrs2* phospho-mutant, although the magnitude of the increase in the human system is not as strong as in yeast. It is conceivable that a stronger NHEJ stimulation would be observed if all putative/minimal CDK consensus sites would be removed from the human protein in the experiments described above. Nevertheless, these observations highlight the conserved features of the phosphoregulation of MRX complex components in evolution.

We have previously shown that Xrs2 and Mre11 are phosphorylated in response to genotoxic stress [9]. Interestingly, we and others have determined that this phosphorylation event was dependent solely on the ATM-family of kinases, since inactivation of checkpoint kinases downstream of Tel1/Mec1 had no effect on MRX phosphorylation [9, 58]. However, a previous study revealed that removal of the preferred ATM phospho-consensus sites in Xrs2 caused no detectable consequences on DNA damage sensitivity [63]. Our analysis of Xrs2/Mre11 phosphorylation provides some insight on this surprising result. Indeed, we show here that removal of the canonical ATM consensus sites on Xrs2 is insufficient to abrogate DNA damage-dependent phosphorylation of this substrate. Complete elimination of this regulatory event necessitates the removal of phosphorylation sites that do not fit the canonical consensus of ATM kinase. This result is consistent with the observation that members of the ATM/ATR-family of kinases –like many other kinases– are sometimes capable of phosphorylating substrates on residues that do not fit their canonical consensus motif [134-137]. Beyond the question of Tel1/ATM specificity, our results also explain why mutations in the Tel1-dependent phosphorylation sites of Xrs2 showed no specific DNA damage sensitivity [63]. Indeed, we show herein that regulation of the MRX complex by Tel1/Mec1 specifically affects DSB repair by end-joining, a process that plays a modest role in DSB repair under standard growth conditions in yeast (*e.g.*, [139]). Removal of the DNA damage-dependent phospho-sites on Xrs2 revealed that these sites are necessary to promote NHEJ *in vivo*. This result is consistent with the observation that checkpoint kinases have previously been shown to stimulate NHEJ repair of DSBs [64]. In particular, the DNA damage-dependent phosphorylation of Nej1/Lif2 by checkpoint kinases appears to be critical for efficient NHEJ [147]. Thus, the efficiency of NHEJ, like that of HR, appears to be directly modulated by protein phosphorylation at multiple levels within the repair machinery. It is interesting to note

that the requirement for DNA damage-dependent phosphorylation of Xrs2 in the promotion of NHEJ appears dominant over the cell cycle-mediated stimulation of NHEJ observed in CDK-site mutants (*i.e.*, the stimulation of NHEJ observed in the *xrs2-7A* mutant is lost in the *xrs2-27A* mutant; Fig. 6). This likely indicates that DNA repair must be coordinated specifically at sites of DNA damage, not solely by overall cell cycle status.

In conclusion, we show in this study that the MRX complex is regulated by distinct phospho-dependent regulatory pathways in cells. These pathways respond to different signals—cell cycle status and DNA damage—and result in differing consequences for the regulation of NHEJ. Our data indicate that the preference for using HR-based mechanisms to repair DSBs in G2/M phase of the cell cycle is not only regulated at the level the HR machinery itself, as previously thought, but also at the level of the NHEJ machinery. The mechanism proposed here are likely to be relevant in higher eukaryotes since both ATM and the MRN complex positively regulate DNA repair through NHEJ [65, 148, 149]. In this regard, it will be exciting to determine whether the regulatory mechanisms described herein contribute to the DNA damage sensitivity and poor prognosis associated with human disease such as the Nijmegen breakage syndrome and ataxia telangiectasia.

MATERIALS AND METHODS

Yeast manipulations and growth conditions

Yeast genetics and molecular biology manipulations were performed according to St-Pierre *et al.* [150]. Standard procedures were used for SDS-PAGE/NextGel electrophoresis, western blotting, DNA damage sensitivity assays, fluorescence microscopy, FACS analysis, *P_{GAL10-1}*-driven overexpression, protein purification, and kinase assays [9, 151, 152]. Analysis of DSB end resection was carried out according to published procedures [69]. A comprehensive description of all yeast strains and experimental procedures used in this study is included Supplemental Materials and methods.

Mutant generation

For mutant generation, *XRS2* and *MRE11* genes were cloned in a 2μ *URA3 leu2-d*-containing shuttle plasmid and pFA6A-derived plasmid, respectively, and mutations were introduced by site-directed mutagenesis (Quickchange, Stratagene). *xrs2-27A* mutant was partially synthesized as a *xrs2-23A* fragment (BioBasic) which was cloned in a YIplac204-*XRS2* plasmid replacing its respective wild-type counterpart. Further mutations were introduced by site-directed mutagenesis of this construct. Modified genes were integrated in the genome by recombination, replacing the wild-type versions. After transformation, the genomic loci of all phospho-mutant alleles of *XRS2* and *MRE11* used in this study were sequenced to confirm the presence of the relevant mutations and the absence of secondary mutation.

Protein purification

Xrs2 and Mre11 were overexpressed in yeast strains D1374 and D2540, respectively. These strains express either Xrs2–His–HA or Mre11–His–StrepTagII under the control of the *GALI* promoter on 2μ *URA3 leu2-d*-derived plasmids. Conditions for culture and preparation of cell lysate are as previously described [152]. Xrs2 and Mre11 were purified by metal-chelate chromatography using standard procedures (Ni-NTA; Qiagen). Mutant Xrs2-7A and Mre11-6A were purified by the same methods in strains D2446 and D2541 respectively. Active Cdc28-Clb2 kinase was purified according to published procedures [151].

***In vitro* phosphorylation and dephosphorylation of Xrs2 and Mre11**

Purified wild-type and mutant Xrs2 or Mre11 were incubated in kinase buffer [151] supplemented with 100 μ M ATP and purified Cdc28-Clb2. Reactions were performed at 30°C for 15 minutes and stopped by addition of sample buffer. For dephosphorylation experiments, asynchronous cells were lysed [152] in lysis buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 100 mM KCl, 100 mM NaF, 10% glycerol, 0.1% tween 20, 1 mM tungstat, 1 mM DTT, 10 μ M AEBSF, 10 μ M pepstatin A, 10 μ M E-64). Xrs2-HA was immunoprecipitated using anti-HA 16B12 antibody bound to Gammabind Plus Sepharose beads (GE Healthcare). Beads were resuspended in lambda-ppase buffer (NEB) and were incubated for 30 minutes at 30°C with or without purified lambda phosphatase [151].

Protein samples and SDS-PAGE

Protein samples were prepared from yeast cultures using the TCA-glass bead method described in [153]. For Xrs2 cell cycle/CDK phosphorylation analysis, protein samples were resolved on 8% SDS-polyacrylamide gels in a BioRad Mini-Protean gel system (200V for 105 mins). The modification status of Mre11 after *in vitro* phosphorylation was determined by migration on a 10% SDS-polyacrylamide gel using the same setup. For the DNA damage-dependent phosphorylation analysis of Xrs2, samples were resolved on 7.5% NextGel acrylamide gels. *In vivo* Mre11 phosphorylation events were analyzed by migration on a 6% SDS-polyacrylamide gel supplemented with 20 μ M Phos-Tag and 40 μ M $MnCl_2$. Xrs2 and Mre11 protein samples from DNA damage and *in vivo* experiments, respectively, were run in Hoefer SE 600 Chroma electrophoresis apparatus overnight. For western blotting, proteins were transferred on nitrocellulose membranes by semi-dry transfer. Xrs2-HA or Mre11-MYC were detected with a mouse 12CA5 antibody (1:1000) or a mouse 9E10 antibody (1:1000), respectively [154]. Primary antibody-antigen complexes were revealed with sheep anti-mouse IgGs conjugated to HRP.

DNA damage response phenotypic analysis

For DNA damage sensitivity assays cells were spotted in 5-fold dilution series on YPD or YPD containing different concentrations of DNA damaging agents. Cells were grown for 2-3 days at 30°C.

DSB resection assays

Analysis of ssDNA formation at DSBs was performed according to previously published procedures [69]. Briefly, cells were grown in YEP-Raffinose medium to an OD_{600} of 0.5 before HO endonuclease expression was induced by addition of 2% galactose. Yeast genomic DNA was purified from samples taken at 30 min intervals following HO induction. DNA was digested using StyI and XbaI enzymes and separated by electrophoresis on 1% agarose gels. DNA was transferred on Hybond-N+ membrane (GE healthcare) using a vacuum blotter system (BioRad). ssDNA formation was measured by disappearance of 0.7 and 3kb signal from probes. A probe annealing in the *DNL4* gene was used as loading control.

NHEJ efficiency

For NHEJ efficiency experiments, YCplac33 plasmid was digested with either SphI (3'overhang) or XmaI (5'overhang) and purified by gel extraction. Equal quantities of DNA were transformed in exponentially growing cells using the standard lithium acetate method. Circular YCplac33 was transformed as a control for plasmid transformation efficiency. Cells were plated on SC-URA medium and NHEJ efficiency was measured by determination of the number of colonies growing after transformation with a digested plasmid relative to that obtained with an undigested/circular plasmid [139].

Telomere length analysis

DNA from yeast cells in stationary phase was extracted and digested by XhoI overnight. Digested DNA was separated by migration on 1% agarose gel and transferred on Hybond-N+ membrane (GE healthcare) using a vacuum blotter system (BioRad). Telomeres were detected by using a radiolabeled 280 bp probe consisting of TG repeats.

I-Ppo viability

For I-Ppo viability experiments, cells were grown overnight in SC-URA supplemented with 0.5% glucose to prevent leaky expression from the *GALI* promoter. Cells were diluted to O.D.₆₀₀ 0.4 in Sc-URA supplemented with 2% raffinose and were allowed to grow for 4 hours at room temperature. I-PpoI was induced by addition of 2% galactose and blocked after 2 hours by addition of 2% glucose. Viability is represented as the ratio of colonies growing prior to- and after I-PpoI induction. Three independent experiments were performed in which the average viability of two independent clones was used.

TABLE I. List of Strains

Figure #	Strain #	Genotype
1	1407	<i>XRS2-12HIS-3HA-12HIS::KanMX6</i>
2	1407	<i>XRS2-12HIS-3HA-12HIS::KanMX6</i>
	1874	<i>xrs2-7A-12HIS-3HA-12HIS::KanMX6</i>

	2470	<i>XRS2-12HIS-3HA-12HIS::KanMX6</i> <i>p711 (YEpfAT4-P_{GAL10}-CDC28 P_{GAL1}-CLB2)</i>
	2451	<i>xrs2-7A-12HIS-3HA-12HIS::KanMX6</i> <i>p711 (YEpfAT4-P_{GAL10}-CDC28 P_{GAL1}-CLB2)</i>
	2450	<i>xrs2-7A-12HIS-3HA-12HIS::KanMX6</i> <i>p363 (YEpfAT4-P_{GAL10-1})</i>
	2448	<i>XRS2-12HIS-3HA-12HIS::KanMX6</i> <i>p363 (YEpfAT4-P_{GAL10-1})</i>
	1364	<i>lys2::Pgal1-GAL4 pep4::HIS3 bar1::hisG</i> <i>p613 (YEpfAT4-P_{GAL1}-XRS2-12HIS-3HA-12HIS)</i>
	2446	<i>lys2::Pgal1-GAL4 pep4::HIS3 bar1::hisG</i> <i>p768 (YEpfAT4-P_{GAL1}-xrs2-7A-12HIS-3HA-12HIS)</i>
3	2540	<i>lys2::Pgal1-GAL4 pep4::HIS3 bar1::hisG</i> <i>p781 (YEpfAT4-P_{GAL1}-MRE11-3STII-9HIS)</i>
	2541	<i>lys2::Pgal1-GAL4 pep4::HIS3 bar1::hisG</i> <i>p782 (YEpfAT4-P_{GAL1}-mre11-6xA-3STII-9His)</i>
	3184	<i>MRE11-13MYC::HIS3MX6</i>
	3196	<i>mre11-6A-13MYC::HIS3MX6</i>
4	1407	<i>XRS2-12HIS-3HA-12HIS::KanMX6</i>
	1874	<i>xrs2-7A-12HIS-3HA-12HIS::KanMX6</i>
	2727	<i>xrs2-4A-12HIS-3HA-12HIS::KanMX6</i>
	2728	<i>xrs2-11A-12HIS-3HA-12HIS::KanMX6</i>

TABLE I. (continued)

Figure #	Strain #	Genotype
4	3344	<i>Xrs2-27A-12HIS-3HA-12HIS::KanMX6</i>
	3184	<i>MRE11-13MYC::HIS3MX6</i>
	3196	<i>mre11-6A-13MYC::HIS3MX6</i>
5	3377	<i>MRE11 XRS2</i>

	2351	<i>mre11Δ::HIS3MX6</i>
	3372	<i>xrs2-7A::TRP1</i>
	3373	<i>mre11-6A::KanMX6</i>
	3374	<i>xrs2-7A::TRP1mre11-6A::KanMX6</i>
	2915	<i>xrs2-7E::TRP1</i>
	2938	<i>mre11-6E::KanMX6</i>
	3220	<i>xrs2-7E::TRP1 mre11-6E::KanMX6</i>
	2486	<i>sae2Δ::HPHMX6</i>
	2537	<i>sae2Δ::HPHMX6 mre11-6A::KanMX6</i>
	2538	<i>sae2Δ::HPHMX6 xrs2-7A::TRP1</i>
	2539	<i>sae2Δ::HPHMX6 xrs2-7A::TRP1 mre11-6A::KanMX6</i>
	2858	<i>rad51Δ::HIS3MX6</i>
		<i>ura3-1::URA3 P_{GAL1}-HO</i>
	2861	<i>rad51Δ::HIS3MX6 xrs2-7A::TRP1</i>
		<i>ura3-1::URA3 P_{GAL1}-HO</i>
6	3377	<i>MRE11 XRS2</i>
	2351	<i>mre11Δ::HIS3MX6</i>
	3373	<i>mre11-6A::KanMX6</i>
	3375	<i>xrs2-27A::TRP1</i>
	3376	<i>xrs2-27A::TRP1 mre11-6A::KanMX6</i>

TABLE I. (continued)

Figure #	Strain #	Genotype	
6	3372	<i>xrs2-7A::TRP1</i>	
	3373	<i>mre11-6A::KanMX6</i>	
	2529	<i>rad51Δ::HIS3MX6</i>	
	2525	<i>rad51Δ::HIS3MX6 xrs2-7A::TRP1 mre11-6A::KanMX6</i>	
	3038	<i>rad51Δ::HIS3MX6 xrs2-7E::TRP1 mre11-6E::KanMX6</i>	
	3416	<i>rad51Δ::HIS3MX6 xrs2-27A::TRP1</i>	
	3419	<i>rad51Δ::HIS3MX6 xrs2-27A::TRP1 mre11-6A::KanMX6</i>	
	3453	<i>MRE11 XRS2 p427(P_{GAL}-I-Ppo)</i>	
	3454	<i>MRE11 XRS2 p427(P_{GAL}-I-Ppo)</i>	
	3459	<i>xrs2-7A::TRP1 mre11-6A::KanMX6 p427(P_{GAL}-I-Ppo)</i>	
	3460	<i>xrs2-7A::TRP1 mre11-6A::KanMX6 p427(P_{GAL}-I-Ppo)</i>	
	3461	<i>xrs2-27A::TRP1 p427(P_{GAL}-I-Ppo)</i>	
	3462	<i>xrs2-27A::TRP1 p427(P_{GAL}-I-Ppo)</i>	
	3470	<i>yku70Δ::HphMX6 p427(P_{GAL}-I-Ppo)</i>	
	3471	<i>yku70Δ::HphMX6 p427(P_{GAL}-I-Ppo)</i>	
	S1	1407	<i>XRS2-12HIS-3HA-12HIS::KanMX6</i>
		3102	<i>XRS2-12HIS-3HA-12HIS::KanMX6 mre11-6A::KanMX6</i>
3103		<i>XRS2-12HIS-3HA-12HIS::KanMX6 mre11-6E::KanMX6</i>	
3184		<i>MRE11-13MYC::HIS3MX6</i>	
3255		<i>MRE11-13MYC::HIS3MX6 xrs2-7A::TRP1</i>	
3256		<i>MRE11-13MYC::HIS3MX6 xrs2-7E::TRP1</i>	
S2	1364	<i>lys2::Pgal1-GAL4 pep4::HIS3 bar1::hisG</i> <i>p613 (YE_pFAT4-P_{GAL1}-XRS2-12HIS-3HA-12HIS)</i>	
S3	3001	<i>rad51Δ::HIS3MX6 ura3-1::URA3 P_{GAL1}-HO</i>	

TABLE I. (continued)

Figure #	Strain #	Genotype
S3		<i>exo1Δ::HPHMX6</i>
	3000	<i>rad51Δ::HIS3MX6 ura3-1::URA3 P_{GAL1}-HO</i> <i>exo1Δ::HPHMX6 xrs2-7A::TRP1 mre11-6A::KanMX6</i>
	3020	<i>rad51Δ::HIS3MX6 ura3-1::URA3 P_{GAL1}-HO</i> <i>sgs1Δ::NATMX6</i>
	3104	<i>rad51Δ::HIS3MX6 ura3-1::URA3 P_{GAL1}-HO</i> <i>sgs1Δ::NATMX6 xrs2-7A::TRP1 mre11-6A::KanMX6</i>

ACKNOWLEDGMENTS

We would like to thank Drs Julie St-Pierre and Lea Harrington for comments on the manuscript. We would also like to thank Dr R. Driscoll for discussions on *xrs2* phenotypes. This study was supported by grants to D.D. from the CIHR (MOP 82912) and CCSRI (grant 20304). D.D. is recipient of a Tier II Canada Research Chair in Cell Cycle Regulation and Genomic Integrity.

Conclusion

Ce mémoire met en lumière deux systèmes parallèles de régulation des fonctions du complexe MRX par la phosphorylation. L'un dépend de la progression du cycle cellulaire mitotique et de la kinase Cdc28 tandis que l'autre dépend de la présence de bris double-brins. Or, ces deux systèmes ont un effet opposé sur les fonctions du complexe dans la voie de réparation des bris double-brins et semblent antagonistes. Ceci place donc le complexe MRX au centre de la sélection de la voie adoptée pour la réparation des bris double-brins.

La phosphorylation du complexe MRX au cours du cycle cellulaire

Nous montrons dans cette étude que Xrs2 et Mre11 sont des substrats pour la phosphorylation par Cdc28. De plus, nous avons identifié ces sites de phosphorylation sur Xrs2 et Mre11. Cependant, la dynamique de phosphorylation diffère entre ces deux sous-unités. En effet, nos résultats montrent que Xrs2 est phosphorylé spécifiquement en phase G2/M, tandis que Mre11 semble phosphorylé uniformément tout au long du cycle cellulaire.

La corrélation de la phosphorylation de Xrs2, de Sae2 [105] et de Dna2 [106], ainsi que le rôle établi de ces trois protéines dans la recombinaison homologue suggère que Xrs2 est aussi régulé par la phosphorylation pour son rôle dans la résection. Cependant, nous n'avons pu détecter de défauts au niveau du mécanisme de résection dans les mutants non-phosphorylables du complexe MRX. La nucléase HO utilisée dans les expériences d'efficacité de résection produit un bris double-brin propre, c'est-à-dire que les bases aux extrémités ne sont pas endommagées. Tel que discuté précédemment, l'activité nucléase de Mre11 n'est requise que pour certains types de bris double-brins dont les extrémités sont liées de manière covalente à des protéines ou lorsqu'une excision des bases est requise. Ainsi, la phosphorylation au cours du cycle cellulaire de Xrs2 pourrait potentiellement activer les fonctions nucléase de Mre11 lorsque les extrémités des bris double-brins sont inaccessibles ou endommagées. Il est aussi possible que les expériences de résections effectuées dans notre étude ne soient pas assez sensibles pour détecter l'effet de la phosphorylation du complexe. Il

serait alors pertinent de reconstituer le système de résection *in vitro* avec les complexes MRX, Sgs1-Dna2 et Exo1, purifiés pour déterminer l'effet de la phosphorylation par Cdc28 sur la cinétique de résection avec une plus grande sensibilité.

La phosphorylation de Mre11 semble quant à elle indépendante de la progression du cycle cellulaire. Ceci ne concorde pas avec le pic d'activité de Cdc28 en complexe avec des cyclines mitotiques en phase G2/M du cycle cellulaire. Cependant, Cdc28 est en complexe avec d'autres cyclines tout au long du cycle cellulaire et donc pourrait avoir la même spécificité pour Mre11 indépendamment de la progression mitotique et de la cycline interagissant avec Cdc28. Un cas similaire a d'ailleurs été répertorié chez Abp1 [130]. Ceci suggérerait que Mre11 occupe deux fonctions distinctes qui dépendent de son état de phosphorylation ou bien que cette protéine est dynamiquement phosphorylée au cours d'un processus pouvant avoir lieu tout le long du cycle cellulaire. Cependant, il serait aussi possible que Mre11 puisse être la cible des MAP kinases de la voie de réponse à la phéromone facteur α . En effet, ces kinases possèdent une spécificité de substrats similaire à celle du consensus minimal de Cdc28 (sites Ser/Thr-Pro) [155]. Ainsi, puisque les expériences de synchronisation en G1 exigent une très grande quantité de facteur α et la voie des MAP kinases est alors suractivée. Il est alors possible que cette voie puisse phosphoryler spécifiquement Mre11 en phase G1 du cycle cellulaire, faisant en sorte que Mre11 apparaît phosphorylé tout au long du cycle cellulaire. Pour vérifier ceci, nous pourrions exprimer un mutant *STE11-4* qui active constitutivement la voie MAP kinase sans besoin de facteur α [156]. Si les kinases de cette voie peuvent phosphoryler Mre11, on devrait alors observer une augmentation de la fraction phosphorylée de Mre11.

Notre étude démontre que la phosphorylation de Mre11 et Xrs2 par Cdc28 inhibe la voie de réparation des bris double-brins par JENH. La phosphorylation de Mre11 limiterait alors le JENH indépendamment de la progression du cycle cellulaire. Supportant cette hypothèse, certains types de bris double-brins sont difficilement réparés par JENH en phase G1 chez *S. cerevisiae* [85]. C'est notamment le cas lorsque les bris double-brins sont causés par des radiations ionisantes ou des agents chimiques causant des dommages similaires. Par ailleurs, la phosphorylation de Xrs2 en G2/M renforcerait l'inhibition de la voie de JENH durant cette phase. Par un effet de vase communicant, ceci favoriserait la voie de

recombinaison homologue pour la réparation des bris double-brins. Notre étude fournit donc des évidences montrant que la régulation du complexe MRX par la phosphorylation au cours du cycle cellulaire permettrait de modifier la balance entre le JENH et la recombinaison homologue.

Le complexe MRX est important pour la dissociation active de l'hétéroduplexe yKu70/80 de l'ADN spécifiquement en phase G2/M du cycle cellulaire [69, 96, 97]. Cet hétéroduplexe est crucial pour la réparation des bris double-brins par JENH [27, 82]. Or, on observe une augmentation de l'efficacité du JENH lorsque Mre11 et Xrs2 sont insensibles à la phosphorylation par Cdc28, tandis que l'on note une diminution de son efficacité lorsque les deux protéines sont constitutivement phosphorylés (article Figure 6). Ainsi, une explication plausible est que la phosphorylation du complexe MRX observée en phase G2/M aurait pour rôle de promouvoir la dissociation du complexe Yku70/80 de l'ADN. Ceci aurait pour effet d'inhiber le recrutement du complexe Dnl4-Lif1-Nej1 au bris double-brin, empêchant alors la réparation par JENH. En l'absence de complexe Yku70/80 au bris double-brin, la recombinaison homologue serait donc indirectement stimulée par une augmentation du recrutement des nucléases Exo1 et Dna2 (Figure 4). Malgré l'absence d'effet de la phosphorylation du complexe MRX sur l'étape de résection (article Figures 5 et S3), il serait particulièrement intéressant d'étudier la cinétique et l'efficacité de recrutement du complexe Yku70/80 à un bris double-brin inductible par immunoprécipitation de chromatine (CHIP) en phases G1 et G2/M du cycle cellulaire. En se fiant aux résultats d'efficacité de JENH, on s'attendrait à ce que le niveau de liaison de Yku70/80 à l'ADN demeure constant ou même augmente indépendamment de la phase du cycle cellulaire lorsqu'on élimine la phosphorylation du complexe MRX chez le mutant *xrs2-7A mre11-6A*. À l'inverse, on observerait une diminution lorsque le complexe MRX est constitutivement phosphorylé chez le mutant *xrs2-7E mre11-6E*.

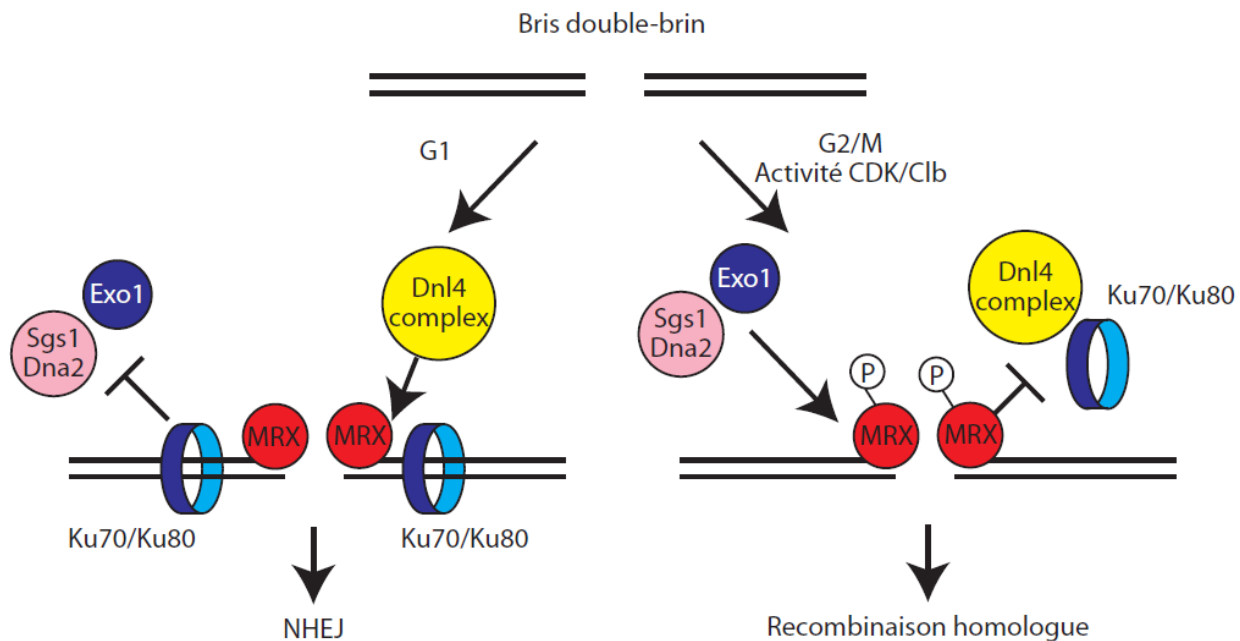


Figure 4. Modèle du mécanisme moléculaire de la phosphorylation du complexe MRX par Cdk

Le complexe Yku70/80 lie préférentiellement l'ADN double-brin plutôt que l'ADN simple-brin *in vitro* [119] et il semble être dissocié de l'ADN spécifiquement en phase G2/M par le complexe MRX [97]. Le complexe MRX possède des activités endonucléases et exonucléases *in vitro* [3] et il a été ainsi proposé que le complexe MRX a pour rôle de résecter un court oligonucléotide aux extrémités du bris double-brin pour stimuler la dissociation du complexe Yku70/80 (Figure 5) [69, 73]. Il serait alors très intéressant vérifier si la phosphorylation de Mre11 et Xrs2 par Cdc28 stimule les activités nucléases du complexe entier *in vitro*. Ces expériences permettraient donc de relier l'effet observé de la phosphorylation sur la voie de réparation par JENH et les fonctions moléculaires du complexe MRX.

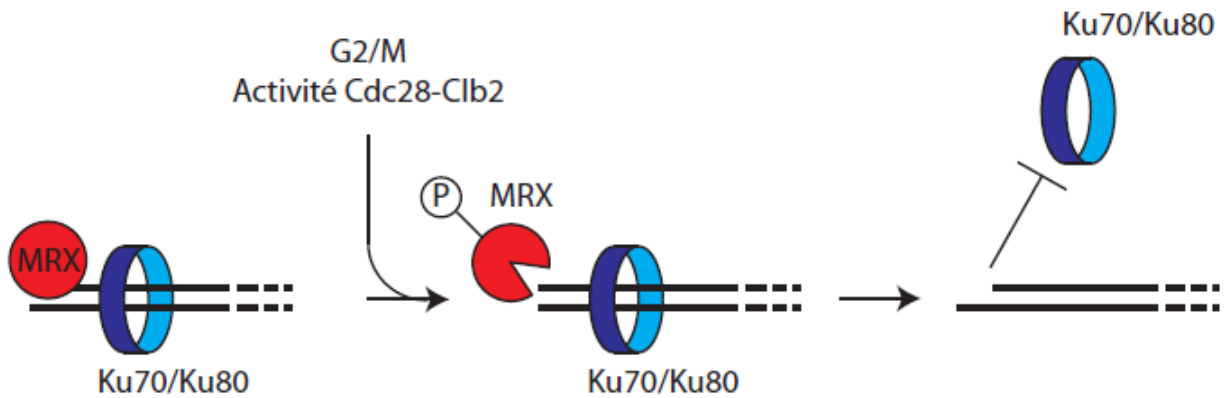


Figure 5. Mécanisme proposé de la dissociation du complexe Ku70/Ku80 en phase G2/M du cycle cellulaire

Un plus faible recrutement du groupe Dnl4-Lif1-Nej1 aux bris double-brins par le complexe MRX sans moduler l'association de Yku70/80 pourrait être un autre mécanisme expliquant l'inhibition de la voie de JENH par l'activité de Cdc28 sans nécessairement dissocier le complexe Yku70/80. Il serait donc intéressant d'observer la cinétique de recrutement aux bris double-brins de tous ces facteurs par CHIP. De plus, plusieurs études démontrent que Xrs2 recrute le complexe DNA ligase IV par l'interaction entre son domaine FHA et des thréonines phosphorylées de Lif1 [83, 84]. Il serait donc intéressant d'étudier si l'état de phosphorylation de Mre11 et Xrs2 module l'interaction entre Lif1 et Xrs2. Ainsi, une plus faible interaction entre ces deux protéines laisserait suggérer qu'il puisse y avoir des modifications structurales de Mre11 et Xrs2 qui inhibent la liaison du domaine FHA de Xrs2 à Lif1. Or, dans ce mémoire, la thréonine 555 a été identifiée comme étant phosphorylée par Cdc28 en phase G2/M du cycle cellulaire. Puisque les domaines FHA se lient préférentiellement aux thréonines phosphorylées, il serait possible qu'il y ait interaction intramoléculaire entre le domaine FHA et la thréonine 555 de Xrs2. Ceci aurait pour effet de replier la protéine Xrs2 sur elle-même et de rendre indisponible le domaine FHA pour la liaison à Lif1. De plus, cette modification structurale aurait potentiellement pour effet de repositionner les domaines BRCT de Xrs2 vis-à-vis des sérines identifiées comme étant phosphorylées par Cdc28, favorisant ainsi leur interaction et le renforcement de la structure

"repliée" de Xrs2 (Figure 6). La phosphorylation de Mre11 par Cdc28 aurait quant à elle potentiellement pour rôle de stimuler la formation de cette structure.

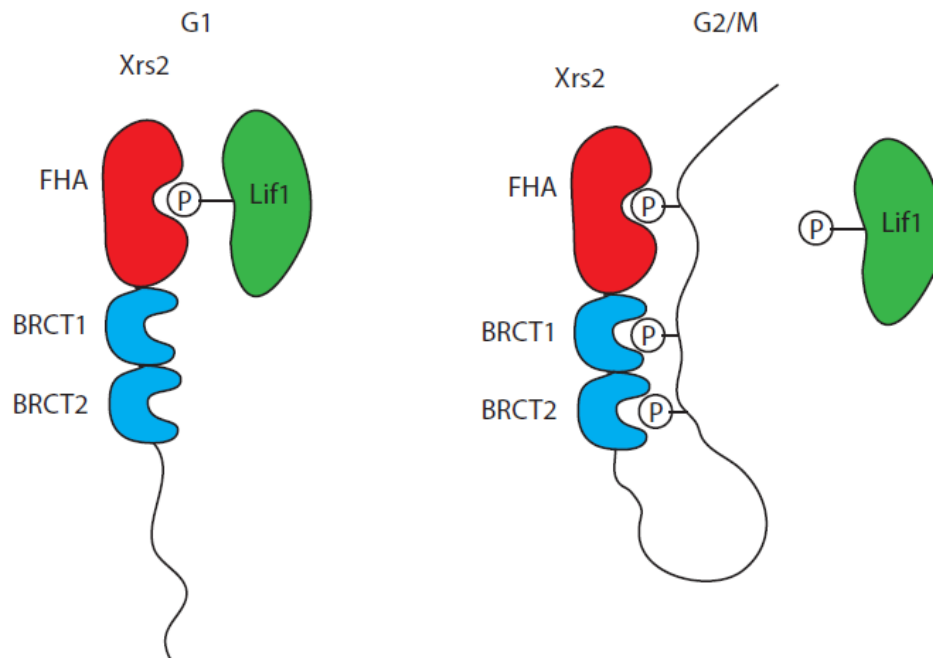


Figure 6. Modèle du repliement intramolécule de Xrs2

Pour vérifier cette hypothèse, nous pourrions exprimer chez *S. cerevisiae* deux versions tronquées de Xrs2, l'une contenant la section N-terminale de la protéine et donc les domaines FHA et BRCT et l'autre contenant la partie C-terminale qui inclue les sites phosphorylables par Cdc28. L'interaction entre ces deux domaines pourrait ensuite être évaluée par co-immunoprécipitation. On pourrait par la suite comparer l'intensité de l'interaction lorsque la partie C-terminale est phosphorylée ou non dans les mutants *xrs2-7E* ou *xrs2-7A* respectivement. Dans le cas où l'hypothèse précédente est valable, on devrait ainsi retrouver une interaction plus forte entre les deux sections de Xrs2 lorsque la partie C-terminale est phosphorylée. Selon cette logique, des mutations inactivatrices dans les domaines FHA ou BRCT devraient inhiber significativement l'interaction entre les sections N- et C-terminales de Xrs2. Les expériences et hypothèses présentées ci-haut permettraient donc d'approfondir notre compréhension des mécanismes moléculaires par lesquels Cdc28 inhiberait le JENH pour favoriser la voie de recombinaison homologue en phase G2/M du cycle cellulaire.

La phosphorylation du complexe MRX en réponse aux dommages à l'ADN

En parallèle à la phosphorylation par Cdc28, les protéines Mre11 et Xrs2 sont aussi sujettes à une phosphorylation qui dépend de la détection de dommages à l'ADN. Nous avons identifié dans cette étude la majorité des sites sur Xrs2 qui sont vraisemblablement phosphorylés dans ce contexte. En effet, Xrs2 est extensivement phosphorylé sur des sites consensus minimaux primaires (Ser/Thr-Gln) et secondaires pour la phosphorylation par Tel1 et Mec1. Il est intéressant de noter que la mutation de 27 sérines et thréonines en résidus non-phosphorylables (*i.e.* alanines) ne perturbe pas significativement les fonctions de réponse aux dommages à l'ADN et de réplication des télomères. Notre étude démontre en fait que la fonction de la phosphorylation par Tel1/Mec1 sur ces sites est spécifique à la voie de réparation par JENH. Cette évidence concorde avec de précédentes études qui démontrent que les kinases des points de contrôle des dommages à l'ADN stimulent la voie de JENH [64]. De plus, il a été démontré que la phosphorylation en réponse aux dommages à l'ADN de Nej1 est critique à la réparation par JENH [147].

Dans le but d'étudier le mécanisme moléculaire sous-jacent à l'importance de la phosphorylation de Xrs2 par Tel1/Mec1 dans la voie de JENH, il serait intéressant d'évaluer encore ici les cinétiques de recrutement des complexes Yku70/80 et Lif1-Dnl4-Nej1 au site d'un bris double-brin par CHIP. Puisque l'efficacité de JENH est diminuée d'environ 50% chez le mutant *xrs2-27A*, on s'attendrait à une diminution de l'efficacité de recrutement de certains membres de ces complexes à l'ADN environnant le bris double-brin. Quoiqu'il n'y ait aucune interaction directe entre Dnl4 et Xrs2 répertoriée dans la littérature, Dnl4 possède deux domaines BRCT en tandem [157] qui pourraient reconnaître les sérines phosphorylées par Tel1/Mec1 de Xrs2. Ceci pourrait donc avoir pour effet de stimuler l'efficacité de ligation des extrémités du bris double-brin lors de la JENH. D'autre part, puisque Xrs2 semble être phosphorylé sur un nombre important de sites en réponse aux dommages à l'ADN, il est aussi probable que la charge effective de la protéine soit importante pour la voie de JENH et pour le recrutement de ses facteurs. Plusieurs des protéines de JENH se lient à l'ADN, notamment par des interactions avec le squelette ribose-phosphate qui est lui-même chargé négativement

[158]. Ainsi, une grande quantité de charges négatives sur Xrs2 pourrait favoriser le recrutement spécifique des facteurs de la voie de JENH et augmenter la concentration effective des facteurs de JENH autour du bris double-brin (Figure 7). Cette hypothèse pourrait être vérifiée par la mesure de l'efficacité de JENH lorsqu'on ajoute une épitope chargée négativement (riche en glutamates et aspartates) ou positivement (riche en lysines et arginines) à la séquence d'acides aminés de Xrs2. On devrait alors observer une augmentation de l'efficacité de JENH lorsque Xrs2 est chargé négativement et à l'inverse, on noterait une diminution de l'efficacité de JENH lorsque Xrs2 possède une épitope positive.

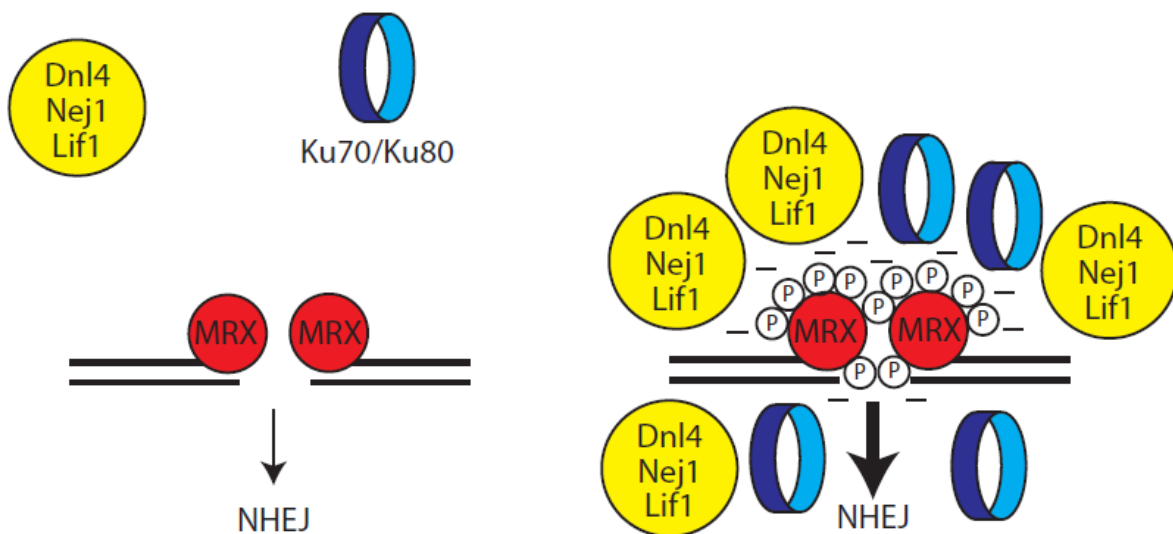


Figure 7. Augmentation de la concentration effective des facteurs de JENH par l'hyper-phosphorylation du complexe MRX

En ce qui concerne Mre11, nous n'avons pas été en mesure d'identifier les sérines et thréonines ciblés par les kinases Tel1 et Mec1 en réponse aux dommages à l'ADN. Néanmoins, contrairement à Xrs2, la phosphorylation ne semble pas avoir lieu sur les sites Ser/Thr-Pro. En fait, la phosphorylation paraît se produire spécifiquement sur la fraction non-préalablement phosphorylé par Cdc28. En effet, l'élimination de la phosphorylation par Cdc28 chez le mutant *mre11-6A* ne résulte pas en un changement de la mobilité sur gel de la fraction de Mre11 phosphorylée en réponse aux dommages à l'ADN. Ceci suggère donc que les événements de phosphorylation par Cdc28 et Tel1/Mec1 sont non-additifs et potentiellement mutuellement exclusifs. D'ailleurs, la phosphorylation par Tel1/Mec1 de Xrs2 et Mre11 peut

avoir lieu lorsque l'activité de Cdc28 en complexe avec les cyclines mitotiques est à son minimum en phase G1 du cycle cellulaire. Ceci indique donc que la phosphorylation par Tel1/Mec1 ne dépend pas de Cdc28-Clb2 et aussi que ces kinases peuvent phosphoryler Xrs2 et Mre11 indépendamment de la progression du cycle cellulaire.

Ceci soulève la possibilité que certains des sept sites sur Xrs2 identifiés comme étant phosphorylés par Cdc28 sont en fait phosphorylés spécifiquement en réponse aux dommages à l'ADN. En effet, bien qu'on élimine totalement la phosphorylation par Cdc28 chez le mutant *xrs2-7A* (article Figure 2), il est probable que certaines des sérines et thréonines mutées en alanines ne soient pas phosphorylées par Cdc28, mais plutôt par Tel1/Mec1. D'ailleurs, on observe une diminution de la phosphorylation en réponse aux dommages à l'ADN chez ce mutant (article Figure 4). Puisque les deux voies de phosphorylation ont des effets opposés sur la voie de JENH, il serait donc important de décortiquer ceux qui sont responsables de la phosphorylation en réponse aux dommages à l'ADN de ceux qui sont phosphorylés par Cdc28.

Le complexe MRX, au centre du choix de la voie de réparation des bris double-brins

Curieusement, tel que discuté ci-haut, deux systèmes indépendant modifiant le complexe MRX par la phosphorylation ont des effets opposés sur la voie de réparation du JENH. La phosphorylation en G2/M du complexe par Cdc28 inhibe le JENH, tandis que la phosphorylation du complexe par Tel1/Mec1 en réponse aux dommages à l'ADN stimule le JENH indépendamment de la phase du cycle cellulaire. Or, il peut paraître étrange qu'en phase G2/M, ces deux processus antagonistes coexistent. Cependant, la phosphorylation de Xrs2 semble dépendre de la quantité de bris dans l'ADN. En effet, même si nous n'avons pas étudié la relation directe dose/phosphorylation, le MMS qui cause peu de bris double-brins provoque un retard de migration de Xrs2 nettement moins élevé que lorsque les cellules sont traitées au 4-NQO ou à la zeocin. Des études *in vitro* de préférence de substrats des homologues humains ATM/Tel1 et ATR/Mec1 démontrent que ces kinases ont une préférence marquée pour des

sérines ou thréonines suivies de glutamine. Elles peuvent aussi phosphoryler des sérines suivies de glycine, glutamate ou aspartate, mais avec une plus faible spécificité [134-137]. Ainsi, une faible activation de ces kinases résulterait en la phosphorylation préférentielle des résidus Ser/Thr-Gln, tandis qu'une forte activation résulterait en la phosphorylation des résidus moins spécifiques. Ceci suggère donc une relation directe entre le taux de bris double-brins et l'état de phosphorylation de Xrs2, et donc intrinsèquement de la stimulation de la voie de JENH. Ainsi, l'étendue de la phosphorylation en réponse aux dommages à l'ADN pourrait contrebalancer l'effet de celle ayant lieu spécifiquement en phase G2/M.

La levure *S. cerevisiae* dépend majoritairement de la recombinaison homologue pour la réparation des bris double-brins. Les mutants de la voie du JENH entraînent une sensibilité aux dommages aigus à l'ADN, mais pas à des dommages chroniques [82, 139, 140, 147]. Ainsi, la voie de JENH chez la levure ne semble importante pour la stabilité génomique que lorsque la cellule est confrontée à de multiples dommages. Notre étude suggère que le complexe MRX agit comme un phospho-senseur de la quantité de bris double-brins dans l'ADN et que sa phosphorylation en réponse aux dommages à l'ADN stimule le JENH. Le complexe est rapidement recruté aux bris double-brins et sa phosphorylation pourrait alors moduler la balance entre le JENH et la recombinaison homologue.

Ainsi, nous suggérons un modèle selon lequel le complexe MRX intègrerait la progression du cycle cellulaire et la quantité de dommages à l'ADN dans le choix de la voie de réparation de bris double-brins. En présence d'une faible quantité de bris double-brins dans l'ADN, la régulation par Cdc28 du complexe MRX favoriserait la voie de recombinaison homologue en phase G2/M en inhibant le JENH (Figure 8 gauche). En revanche, lorsque la cellule fait face à un nombre important de bris double-brins, le complexe MRX est alors hyperphosphorylé, ce qui stimule le JENH (Figure 8 droite). La recombinaison homologue est un mécanisme de réparation fidèle qui produit peu d'erreur. Cependant, c'est un processus encombrant qui requiert une grande quantité de facteurs et plusieurs étapes. Ainsi, lorsqu'une grande quantité de bris double-brins affecte l'ADN, le mécanisme de recombinaison homologue pourrait être surchargé. La cellule se rabattrait alors vers un mécanisme pouvant générer des erreurs, mais qui est beaucoup plus rapide : le JENH. Ceci pourrait donc assurer la

réparation rapide des bris double-brins et ainsi favoriser la survie de la cellule en tolérant les contreparties d'un taux de mutations significativement plus élevé.

Dans cette optique, il serait intéressant d'étudier les changements conformationnels qui découlent de l'état de phosphorylation du complexe. Tel que présenté précédemment, il existe une relation intrinsèque entre les fonctions catalytiques de Mre11 et Rad50 et la conformation adoptée par le complexe entier [32, 33, 159, 160]. En particulier, il serait intéressant de déterminer comment les fonctions nucléase et de liaison à l'ADN sont affectées par la phosphorylation. D'autre part, la conformation du complexe dans le cadre du JENH et de la recombinaison homologue semble différente. En plus des hypothèses discuter précédemment, il serait très intéressant de déterminer si l'état de phosphorylation du complexe MRX peut soit favoriser le rapprochement des extrémités double-brins, stimulant ainsi le JENH, ou soit rapprocher les chromatides sœurs par la formation de ponts interchromatidiens pour favoriser la recombinaison homologue.

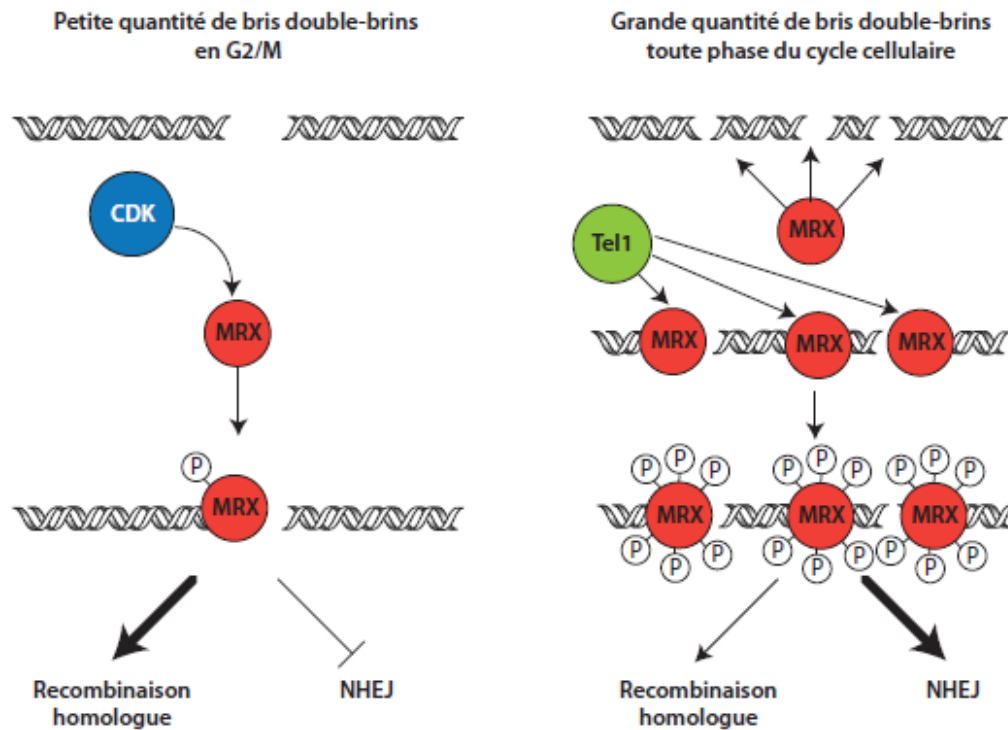


Figure 8. Modèle du rôle de la phosphorylation du complexe MRX dans le choix des voies de réparation

Un système évolutivement conservé

Le modèle ici présenté pourrait tout à fait être pertinent chez les eucaryotes supérieurs tels l'humain. D'ailleurs, deux récentes études démontrent que l'homologue fonctionnel humain de Xrs2, NBS1 est phosphorylé en mitose par CDK sur la sérine 432 stimulant ainsi la recombinaison homologue et inhibant le JENH [120, 121]. De plus, MRE11 interagit directement avec CDK2, un homologue fonctionnel de Cdc28, permettant son recrutement aux bris double-brins et la phosphorylation de CtIP. La proximité de MRE11 à CDK2 suggère alors une éventuelle relation kinase substrat tel qu'identifiée dans la présente étude [146]. La régulation au cours de la progression du cycle cellulaire et la phosphorylation par les CDK semblent donc conservées au cours de l'évolution. La relation entre la phosphorylation du complexe par les kinases de points de contrôle de dommages à l'ADN et la stimulation du JENH semble aussi conservée. En effet, le complexe MRN et ATM, l'homologue de Tel1, ont aussi un effet stimulateur de la voie de JENH chez les cellules humaines [65]. De plus, NBS1 est directement phosphorylé par ATM en réponse aux dommages à l'ADN sur les sérines 278 et 343 [61]. Ainsi, tous les aspects présentés dans notre étude semblent présents chez l'humain, ce qui suggère fortement que le modèle présenté dans ce mémoire l'est aussi. Le complexe MRN/X assurerait donc l'intégrité du génome en sélectionnant la voie optimale de réparation de l'ADN selon la progression du cycle cellulaire et la quantité de dommages à l'ADN.

Il est intéressant de noter que la balance entre la voie du JENH et la recombinaison homologue dépend de l'organisme et du type de cellules. Ainsi, les cellules humaines dépendent en général beaucoup plus de la voie de JENH pour la réparation des bris double-brins que chez la levure [100]. Ceci peut être en partie attribuable au fait que le génome humain est beaucoup plus gros que celui de la levure. Ainsi, probablement qu'il est plus difficile pour le mécanisme de recombinaison homologue de retrouver des régions d'homologie pouvant servir à ce processus de réparation lorsque la taille du génome est considérable. La voie de JENH a évolué de telle sorte que l'humain possède plusieurs protéines supplémentaires, notamment Artemis et DNA-PKcs. Ces deux protéines permettraient ainsi une voie de JENH plus efficace et compétitive vis-à-vis de la

recombinaison homologue. La divergence de la séquence d'acides aminés entre NBS1 et Xrs2 offre une autre piste en accord avec le modèle présenté dans ce mémoire. En effet, NBS1 pourrait avoir évolué de telle sorte que la voie de JENH soit constitutivement favorisée. Une récente étude suggère que les résidus phosphorylés peuvent évoluer en acides aminés négativement chargés et vice-versa [161] permettant de subvenir aux besoins de chaque espèce. En accord avec ceci, certains des sites identifiés sur Xrs2 comme étant potentiellement phosphorylés en réponse aux dommages à l'ADN sont substitués par des résidus négativement chargés chez NBS1 suggérant que cette dernière active constitutivement la voie du JENH. De plus, tel que discuté précédemment, étant donné la grande quantité de résidus phosphorylés sur Xrs2, la charge totale de la protéine pourrait jouer un rôle dans la régulation du JENH. Or, NBS1 a un point isoélectrique significativement plus bas que celui de Xrs2 : 6,6 versus 8,3 respectivement. Ceci suggère donc que NBS1 est plutôt négativement chargé à pH physiologique, ce qui pourrait mimer un état fortement phosphorylé de Xrs2, expliquant alors la plus forte tendance qu'ont les cellules humaines à réparer les bris double-brins par JENH. Une expérience intéressante pour vérifier cette hypothèse serait de compléter des cellules de NBS (contenant la mutation des patients atteints du syndrome de Nimègue) avec NBS1 provenant de différentes espèces phylogénétiquement proches de l'humain, mais dont le point isoélectrique protéique diffère. L'efficacité de JENH pourrait ensuite être mesurée dans les différentes conditions en comparant la fréquence de religation d'un plasmide linéarisé. Dans le cas où la charge effective de la protéine serait importante, on observerait une réduction de l'efficacité de JENH lorsque le point isoélectrique est plus élevé et une augmentation lorsqu'il est plus bas.

Enfin, outre l'enrichissement des connaissances sur la régulation du complexe MRX/N par Cdc28/CDK et Tel1/ATM, notre étude aide à la compréhension de certaines maladies humaines. En effet, des mutations dans NBS1, MRE11 et ATM provoquent des syndromes similaires tels le syndrome de Nijmegen et l'ataxia telangiectasia. Ces maladies sont notamment caractérisées par une forte prédisposition au cancer liée à des défauts dans la réparation de l'ADN chez les patients atteints. Notre étude approfondie donc nos connaissances sur la régulation et la relation fonctionnelle entre le complexe MRN/X et ATM et des maladies qui découlent de leur dysfonctionnement. De plus, plusieurs types de cancers

sont caractérisés par une dérégulation des CDK [162]. Ainsi, les protéines Mre11 et Xrs2/NBS1 pourraient être sujettes elles-mêmes à une dérégulation de leur niveau de phosphorylation, ce qui résulterait en des défauts de leur fonction de réparation de l'ADN. Ce mémoire contribue significativement à la compréhension des processus de réparation de dommages à l'ADN dont la défaillance représente un potentiel cancérigène. Notre étude apporte donc un pas de plus vers la découverte de thérapies pouvant être utilisées dans le traitement de maladies impliquant des défauts de réparation des dommages comme le cancer.

Bibliographie

1. Weemaes, C.M., et al., *A new chromosomal instability disorder: the Nijmegen breakage syndrome*. Acta Paediatr Scand, 1981. **70**(4): p. 557-64.
2. Taylor, A.M., A. Groom, and P.J. Byrd, *Ataxia-telangiectasia-like disorder (ATLD)-its clinical presentation and molecular basis*. DNA Repair (Amst), 2004. **3**(8-9): p. 1219-25.
3. D'Amours, D. and S.P. Jackson, *The Mre11 complex: at the crossroads of dna repair and checkpoint signalling*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2002. **3**(5): p. 317-27.
4. Cox, B.S. and J.M. Parry, *The isolation, genetics and survival characteristics of ultraviolet light-sensitive mutants in yeast*. Mutat Res, 1968. **6**(1): p. 37-55.
5. Suslova, N. and I.A. Zakharov, *The gene-controlled radiation sensitivity of yeast. VII. Identification of the genes for the X-ray sensitivity*. Genetika, 1970. **6**: p. 158-163.
6. Ajimura, M., S.H. Leem, and H. Ogawa, *Identification of new genes required for meiotic recombination in Saccharomyces cerevisiae*. Genetics, 1993. **133**(1): p. 51-66.
7. Williams, R.S., et al., *Mre11 dimers coordinate DNA end bridging and nuclease processing in double-strand-break repair*. Cell, 2008. **135**(1): p. 97-109.
8. Anderson, D.E., et al., *Structure of the Rad50 x Mre11 DNA repair complex from Saccharomyces cerevisiae by electron microscopy*. J Biol Chem, 2001. **276**(40): p. 37027-33.
9. D'Amours, D. and S.P. Jackson, *The yeast Xrs2 complex functions in S phase checkpoint regulation*. Genes Dev, 2001. **15**(17): p. 2238-49.
10. Trujillo, K.M., et al., *Nuclease activities in a complex of human recombination and DNA repair factors Rad50, Mre11, and p95*. J Biol Chem, 1998. **273**(34): p. 21447-50.
11. Trujillo, K.M. and P. Sung, *DNA structure-specific nuclease activities in the Saccharomyces cerevisiae Rad50*Mre11 complex*. J Biol Chem, 2001. **276**(38): p. 35458-64.
12. Krogh, B.O., et al., *Mutations in Mre11 phosphoesterase motif I that impair Saccharomyces cerevisiae Mre11-Rad50-Xrs2 complex stability in addition to nuclease activity*. Genetics, 2005. **171**(4): p. 1561-70.
13. Johzuka, K. and H. Ogawa, *Interaction of Mre11 and Rad50: two proteins required for DNA repair and meiosis-specific double-strand break formation in Saccharomyces cerevisiae*. Genetics, 1995. **139**(4): p. 1521-32.

14. Usui, T., et al., *Complex formation and functional versatility of Mre11 of budding yeast in recombination*. Cell, 1998. **95**(5): p. 705-16.
15. Desai-Mehta, A., K.M. Cerosaletti, and P. Concannon, *Distinct functional domains of nibrin mediate Mre11 binding, focus formation, and nuclear localization*. Mol Cell Biol, 2001. **21**(6): p. 2184-91.
16. Williams, G.J., et al., *ABC ATPase signature helices in Rad50 link nucleotide state to Mre11 interface for DNA repair*. Nat Struct Mol Biol, 2011. **18**(4): p. 423-31.
17. 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.
18. Wiltzius, J.J., et al., *The Rad50 hook domain is a critical determinant of Mre11 complex functions*. Nat Struct Mol Biol, 2005. **12**(5): p. 403-7.
19. Hopfner, K.P., et al., *The Rad50 zinc-hook is a structure joining Mre11 complexes in DNA recombination and repair*. Nature, 2002. **418**(6897): p. 562-6.
20. Stracker, T.H., et al., *The Mre11 complex and the metabolism of chromosome breaks: the importance of communicating and holding things together*. DNA Repair (Amst), 2004. **3**(8-9): p. 845-54.
21. Becker, E., et al., *Detection of a tandem BRCT in Nbs1 and Xrs2 with functional implications in the DNA damage response*. Bioinformatics, 2006. **22**(11): p. 1289-92.
22. Xu, C., et al., *Structure of a second BRCT domain identified in the nijmegen breakage syndrome protein Nbs1 and its function in an MDC1-dependent localization of Nbs1 to DNA damage sites*. J Mol Biol, 2008. **381**(2): p. 361-72.
23. Williams, R.S., et al., *Nbs1 flexibly tethers Ctp1 and Mre11-Rad50 to coordinate DNA double-strand break processing and repair*. Cell, 2009. **139**(1): p. 87-99.
24. Lloyd, J., et al., *A supramodular FHA/BRCT-repeat architecture mediates Nbs1 adaptor function in response to DNA damage*. Cell, 2009. **139**(1): p. 100-11.
25. You, Z., et al., *ATM activation and its recruitment to damaged DNA require binding to the C terminus of Nbs1*. Mol Cell Biol, 2005. **25**(13): p. 5363-79.
26. Nakada, D., K. Matsumoto, and K. Sugimoto, *ATM-related Tell associates with double-strand breaks through an Xrs2-dependent mechanism*. Genes Dev, 2003. **17**(16): p. 1957-62.
27. Chen, L., et al., *Promotion of Dnl4-catalyzed DNA end-joining by the Rad50/Mre11/Xrs2 and Hdf1/Hdf2 complexes*. Mol Cell, 2001. **8**(5): p. 1105-15.

28. Schiller, C.B., et al., *Structure of Mre11-Nbs1 complex yields insights into ataxia-telangiectasia-like disease mutations and DNA damage signaling*. Nat Struct Mol Biol, 2012. **19**(7): p. 693-700.
29. Trujillo, K.M., et al., *Yeast xrs2 binds DNA and helps target rad50 and mre11 to DNA ends*. J Biol Chem, 2003. **278**(49): p. 48957-64.
30. Williams, G.J., S.P. Lees-Miller, and J.A. Tainer, *Mre11-Rad50-Nbs1 conformations and the control of sensing, signaling, and effector responses at DNA double-strand breaks*. DNA Repair (Amst), 2010. **9**(12): p. 1299-306.
31. Hohl, M., et al., *The Rad50 coiled-coil domain is indispensable for Mre11 complex functions*. Nat Struct Mol Biol, 2011. **18**(10): p. 1124-31.
32. Majka, J., et al., *ATP hydrolysis by RAD50 protein switches MRE11 enzyme from endonuclease to exonuclease*. J Biol Chem, 2012. **287**(4): p. 2328-41.
33. Mockel, C., et al., *ATP driven structural changes of the bacterial Mre11:Rad50 catalytic head complex*. Nucleic Acids Res, 2012. **40**(2): p. 914-27.
34. Adelman, C.A., S. De, and J.H. Petrini, *Rad50 is dispensable for the maintenance and viability of postmitotic tissues*. Mol Cell Biol, 2009. **29**(2): p. 483-92.
35. Maser, R.S., et al., *Mre11 complex and DNA replication: linkage to E2F and sites of DNA synthesis*. Mol Cell Biol, 2001. **21**(17): p. 6006-16.
36. Mirzoeva, O.K. and J.H. Petrini, *DNA replication-dependent nuclear dynamics of the Mre11 complex*. Mol Cancer Res, 2003. **1**(3): p. 207-18.
37. Wellinger, R.J. and V.A. Zakian, *Everything You Ever Wanted to Know About Saccharomyces cerevisiae Telomeres: Beginning to End*. Genetics, 2012. **191**(4): p. 1073-105.
38. Faure, V., et al., *Cdc13 and telomerase bind through different mechanisms at the lagging- and leading-strand telomeres*. Mol Cell, 2010. **38**(6): p. 842-52.
39. Mimitou, E.P. and L.S. Symington, *DNA end resection: many nucleases make light work*. DNA Repair (Amst), 2009. **8**(9): p. 983-95.
40. Bonetti, D., et al., *Multiple pathways regulate 3' overhang generation at S. cerevisiae telomeres*. Mol Cell, 2009. **35**(1): p. 70-81.
41. Shima, H., M. Suzuki, and M. Shinohara, *Isolation and characterization of novel xrs2 mutations in Saccharomyces cerevisiae*. Genetics, 2005. **170**(1): p. 71-85.

42. Mallory, J.C. and T.D. Petes, *Protein kinase activity of Tellp and Mec1p, two Saccharomyces cerevisiae proteins related to the human ATM protein kinase*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(25): p. 13749-54.
43. Rouse, J. and S.P. Jackson, *Interfaces between the detection, signaling, and repair of DNA damage*. Science, 2002. **297**(5581): p. 547-51.
44. 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 Dev, 2000. **14**(16): p. 2046-59.
45. Majka, J., A. Niedziela-Majka, and P.M. Burgers, *The checkpoint clamp activates Mec1 kinase during initiation of the DNA damage checkpoint*. Mol Cell, 2006. **24**(6): p. 891-901.
46. Nakada, D., et al., *Role of the C terminus of Mec1 checkpoint kinase in its localization to sites of DNA damage*. Mol Biol Cell, 2005. **16**(11): p. 5227-35.
47. Naiki, T., et al., *Association of Rad9 with double-strand breaks through a Mec1-dependent mechanism*. Mol Cell Biol, 2004. **24**(8): p. 3277-85.
48. Emili, A., *MEC1-dependent phosphorylation of Rad9p in response to DNA damage*. Mol Cell, 1998. **2**(2): p. 183-9.
49. Blankley, R.T. and D. Lydall, *A domain of Rad9 specifically required for activation of Chk1 in budding yeast*. J Cell Sci, 2004. **117**(Pt 4): p. 601-8.
50. Ma, J.L., et al., *Activation of the checkpoint kinase Rad53 by the phosphatidyl inositol kinase-like kinase Mec1*. J Biol Chem, 2006. **281**(7): p. 3954-63.
51. Sweeney, F.D., et al., *Saccharomyces cerevisiae Rad9 acts as a Mec1 adaptor to allow Rad53 activation*. Curr Biol, 2005. **15**(15): p. 1364-75.
52. Kondo, T., et al., *Recruitment of Mec1 and Ddc1 checkpoint proteins to double-strand breaks through distinct mechanisms*. Science, 2001. **294**(5543): p. 867-70.
53. Melo, J.A., J. Cohen, and D.P. Toczyski, *Two checkpoint complexes are independently recruited to sites of DNA damage in vivo*. Genes Dev, 2001. **15**(21): p. 2809-21.
54. Weinert, T., *DNA damage checkpoints update: getting molecular*. Curr Opin Genet Dev, 1998. **8**(2): p. 185-93.
55. Weinert, T., *DNA damage and checkpoint pathways: molecular anatomy and interactions with repair*. Cell, 1998. **94**(5): p. 555-8.
56. Chen, Y. and Y. Sanchez, *Chk1 in the DNA damage response: conserved roles from yeasts to mammals*. DNA Repair (Amst), 2004. **3**(8-9): p. 1025-32.

57. Shiloh, Y., *Ataxia-telangiectasia and the Nijmegen breakage syndrome: related disorders but genes apart*. *Annu Rev Genet*, 1997. **31**: p. 635-62.
58. Usui, T., H. Ogawa, and J.H. Petrini, *A DNA damage response pathway controlled by Tell and the Mre11 complex*. *Mol Cell*, 2001. **7**(6): p. 1255-66.
59. Stewart, G.S., et al., *The DNA double-strand break repair gene hMRE11 is mutated in individuals with an ataxia-telangiectasia-like disorder*. *Cell*, 1999. **99**(6): p. 577-87.
60. Grenon, M., C. Gilbert, and N.F. Lowndes, *Checkpoint activation in response to double-strand breaks requires the Mre11/Rad50/Xrs2 complex*. *Nat Cell Biol*, 2001. **3**(9): p. 844-7.
61. Zhao, S., et al., *Functional link between ataxia-telangiectasia and Nijmegen breakage syndrome gene products*. *Nature*, 2000. **405**(6785): p. 473-7.
62. Wu, X., et al., *ATM phosphorylation of Nijmegen breakage syndrome protein is required in a DNA damage response*. *Nature*, 2000. **405**(6785): p. 477-82.
63. Mallory, J.C., et al., *Amino acid changes in Xrs2p, Dun1p, and Rfa2p that remove the preferred targets of the ATM family of protein kinases do not affect DNA repair or telomere length in Saccharomyces cerevisiae*. *DNA Repair (Amst)*, 2003. **2**(9): p. 1041-64.
64. de la Torre-Ruiz, M. and N.F. Lowndes, *The Saccharomyces cerevisiae DNA damage checkpoint is required for efficient repair of double strand breaks by non-homologous end joining*. *FEBS Lett*, 2000. **467**(2-3): p. 311-5.
65. Rass, E., et al., *Role of Mre11 in chromosomal nonhomologous end joining in mammalian cells*. *Nat Struct Mol Biol*, 2009. **16**(8): p. 819-24.
66. Krejci, L., et al., *Homologous recombination and its regulation*. *Nucleic Acids Res*, 2012. **40**(13): p. 5795-818.
67. Nicolette, M.L., et al., *Mre11-Rad50-Xrs2 and Sae2 promote 5' strand resection of DNA double-strand breaks*. *Nat Struct Mol Biol*, 2010. **17**(12): p. 1478-85.
68. Paull, T.T. and M. Gellert, *The 3' to 5' exonuclease activity of Mre 11 facilitates repair of DNA double-strand breaks*. *Mol Cell*, 1998. **1**(7): p. 969-79.
69. Mimitou, E.P. and L.S. Symington, *Ku prevents Exo1 and Sgs1-dependent resection of DNA ends in the absence of a functional MRX complex or Sae2*. *EMBO J*, 2010. **29**(19): p. 3358-69.
70. Ivanov, E.L., et al., *Mutations in XRS2 and RAD50 delay but do not prevent mating-type switching in Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*, 1994. **14**(5): p. 3414-25.

71. Shim, E.Y., et al., *Saccharomyces cerevisiae Mre11/Rad50/Xrs2 and Ku proteins regulate association of Exo1 and Dna2 with DNA breaks*. EMBO J, 2010. **29**(19): p. 3370-80.
72. Cejka, P., et al., *DNA end resection by Dna2-Sgs1-RPA and its stimulation by Top3-Rmi1 and Mre11-Rad50-Xrs2*. Nature, 2010. **467**(7311): p. 112-6.
73. Mimitou, E.P. and L.S. Symington, *DNA end resection--unraveling the tail*. DNA Repair (Amst), 2011. **10**(3): p. 344-8.
74. 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.
75. Llorente, B. and L.S. Symington, *The Mre11 nuclease is not required for 5' to 3' resection at multiple HO-induced double-strand breaks*. Mol Cell Biol, 2004. **24**(21): p. 9682-94.
76. Garcia, V., et al., *Bidirectional resection of DNA double-strand breaks by Mre11 and Exo1*. Nature, 2011. **479**(7372): p. 241-4.
77. Keeney, S., *Mechanism and control of meiotic recombination initiation*. Curr Top Dev Biol, 2001. **52**: p. 1-53.
78. Borde, V., et al., *Association of Mre11p with double-strand break sites during yeast meiosis*. Mol Cell, 2004. **13**(3): p. 389-401.
79. Moreau, S., J.R. Ferguson, and L.S. Symington, *The nuclease activity of Mre11 is required for meiosis but not for mating type switching, end joining, or telomere maintenance*. Mol Cell Biol, 1999. **19**(1): p. 556-66.
80. Stracker, T.H. and J.H. Petrini, *The MRE11 complex: starting from the ends*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2011. **12**(2): p. 90-103.
81. Chen, X. and A.E. Tomkinson, *Yeast Nej1 is a key participant in the initial end binding and final ligation steps of nonhomologous end joining*. J Biol Chem, 2011. **286**(6): p. 4931-40.
82. Milne, G.T., et al., *Mutations in two Ku homologs define a DNA end-joining repair pathway in Saccharomyces cerevisiae*. Mol Cell Biol, 1996. **16**(8): p. 4189-98.
83. Matsuzaki, K., A. Shinohara, and M. Shinohara, *Forkhead-associated domain of yeast Xrs2, a homolog of human Nbs1, promotes nonhomologous end joining through interaction with a ligase IV partner protein, Lif1*. Genetics, 2008. **179**(1): p. 213-25.
84. Palmbo, P.L., et al., *Recruitment of Saccharomyces cerevisiae Dnl4-Lif1 complex to a double-strand break requires interactions with Yku80 and the Xrs2 FHA domain*. Genetics, 2008. **180**(4): p. 1809-19.

85. Bressan, D.A., B.K. Baxter, and J.H. Petrini, *The Mre11-Rad50-Xrs2 protein complex facilitates homologous recombination-based double-strand break repair in Saccharomyces cerevisiae*. Mol Cell Biol, 1999. **19**(11): p. 7681-7.
86. Zhang, Y., et al., *Role of Dnl4-Lif1 in nonhomologous end-joining repair complex assembly and suppression of homologous recombination*. Nat Struct Mol Biol, 2007. **14**(7): p. 639-46.
87. Ma, Y., et al., *Hairpin opening and overhang processing by an Artemis/DNA-dependent protein kinase complex in nonhomologous end joining and V(D)J recombination*. Cell, 2002. **108**(6): p. 781-94.
88. Budman, J. and G. Chu, *Processing of DNA for nonhomologous end-joining by cell-free extract*. EMBO J, 2005. **24**(4): p. 849-60.
89. Chayot, R., B. Montagne, and M. Ricchetti, *DNA polymerase mu is a global player in the repair of non-homologous end-joining substrates*. DNA Repair (Amst), 2012. **11**(1): p. 22-34.
90. Akopiants, K., et al., *Requirement for XLF/Cernunnos in alignment-based gap filling by DNA polymerases lambda and mu for nonhomologous end joining in human whole-cell extracts*. Nucleic Acids Res, 2009. **37**(12): p. 4055-62.
91. Garcia-Diaz, M., et al., *Template strand scrunching during DNA gap repair synthesis by human polymerase lambda*. Nat Struct Mol Biol, 2009. **16**(9): p. 967-72.
92. Huang, J. and W.S. Dynan, *Reconstitution of the mammalian DNA double-strand break end-joining reaction reveals a requirement for an Mre11/Rad50/NBS1-containing fraction*. Nucleic Acids Res, 2002. **30**(3): p. 667-74.
93. Xie, A., A. Kwok, and R. Scully, *Role of mammalian Mre11 in classical and alternative nonhomologous end joining*. Nat Struct Mol Biol, 2009. **16**(8): p. 814-8.
94. Malu, S., et al., *Role of non-homologous end joining in V(D)J recombination*. Immunol Res, 2012. **54**(1-3): p. 233-46.
95. van der Burg, M., et al., *Loss of juxtaposition of RAG-induced immunoglobulin DNA ends is implicated in the precursor B-cell differentiation defect in NBS patients*. Blood, 2010. **115**(23): p. 4770-7.
96. Wu, D., L.M. Topper, and T.E. Wilson, *Recruitment and dissociation of nonhomologous end joining proteins at a DNA double-strand break in Saccharomyces cerevisiae*. Genetics, 2008. **178**(3): p. 1237-49.
97. Clerici, M., et al., *The Yku70-Yku80 complex contributes to regulate double-strand break processing and checkpoint activation during the cell cycle*. EMBO Rep, 2008. **9**(8): p. 810-8.

98. Pardo, B., B. Gomez-Gonzalez, and A. Aguilera, *DNA repair in mammalian cells: DNA double-strand break repair: how to fix a broken relationship*. Cell Mol Life Sci, 2009. **66**(6): p. 1039-56.
99. Langerak, P. and P. Russell, *Regulatory networks integrating cell cycle control with DNA damage checkpoints and double-strand break repair*. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 2011. **366**(1584): p. 3562-71.
100. Shrivastav, M., L.P. De Haro, and J.A. Nickoloff, *Regulation of DNA double-strand break repair pathway choice*. Cell Res, 2008. **18**(1): p. 134-47.
101. Nasmyth, K., *At the heart of the budding yeast cell cycle*. Trends Genet, 1996. **12**(10): p. 405-12.
102. Enserink, J.M., et al., *Cdc28/Cdk1 positively and negatively affects genome stability in S. cerevisiae*. J Cell Biol, 2009. **185**(3): p. 423-37.
103. Ira, G., et al., *DNA end resection, homologous recombination and DNA damage checkpoint activation require CDK1*. Nature, 2004. **431**(7011): p. 1011-7.
104. Aylon, Y., B. Liefshitz, and M. Kupiec, *The CDK regulates repair of double-strand breaks by homologous recombination during the cell cycle*. EMBO J, 2004. **23**(24): p. 4868-75.
105. Huertas, P., et al., *CDK targets Sae2 to control DNA-end resection and homologous recombination*. Nature, 2008. **455**(7213): p. 689-92.
106. Chen, X., et al., *Cell cycle regulation of DNA double-strand break end resection by Cdk1-dependent Dna2 phosphorylation*. Nat Struct Mol Biol, 2011. **18**(9): p. 1015-9.
107. Saponaro, M., et al., *Cdk1 targets Srs2 to complete synthesis-dependent strand annealing and to promote recombinational repair*. PLoS Genet, 2010. **6**(2): p. e1000858.
108. Huertas, P. and S.P. Jackson, *Human CtIP mediates cell cycle control of DNA end resection and double strand break repair*. J Biol Chem, 2009. **284**(14): p. 9558-65.
109. Vodenicharov, M.D. and R.J. Wellinger, *DNA degradation at unprotected telomeres in yeast is regulated by the CDK1 (Cdc28/Clb) cell-cycle kinase*. Mol Cell, 2006. **24**(1): p. 127-37.
110. DeZwaan, D.C. and B.C. Freeman, *The conserved Est1 protein stimulates telomerase DNA extension activity*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(41): p. 17337-42.
111. Miyake, Y., et al., *RPA-like mammalian Ctc1-Stn1-Ten1 complex binds to single-stranded DNA and protects telomeres independently of the Pot1 pathway*. Mol Cell, 2009. **36**(2): p. 193-206.

112. Li, S., et al., *Cdk1-dependent phosphorylation of Cdc13 coordinates telomere elongation during cell-cycle progression*. Cell, 2009. **136**(1): p. 50-61.
113. Chapman, J.R., Martin R.G. Taylor, and Simon J. Boulton, *Playing the End Game: DNA Double-Strand Break Repair Pathway Choice*. Mol Cell, 2012. **47**(4): p. 497-510.
114. Lee, S.E., et al., *Saccharomyces Ku70, mre11/rad50 and RPA proteins regulate adaptation to G2/M arrest after DNA damage*. Cell, 1998. **94**(3): p. 399-409.
115. Takata, M., et al., *Homologous recombination and non-homologous end-joining pathways of DNA double-strand break repair have overlapping roles in the maintenance of chromosomal integrity in vertebrate cells*. EMBO J, 1998. **17**(18): p. 5497-508.
116. Limbo, O., et al., *Ctp1 is a cell-cycle-regulated protein that functions with Mre11 complex to control double-strand break repair by homologous recombination*. Mol Cell, 2007. **28**(1): p. 134-46.
117. Yu, X. and R. Baer, *Nuclear localization and cell cycle-specific expression of CtIP, a protein that associates with the BRCA1 tumor suppressor*. J Biol Chem, 2000. **275**(24): p. 18541-9.
118. Holt, L.J., et al., *Global analysis of Cdk1 substrate phosphorylation sites provides insights into evolution*. Science, 2009. **325**(5948): p. 1682-6.
119. Foster, S.S., A. Balestrini, and J.H. Petrini, *Functional interplay of the Mre11 nuclease and Ku in the response to replication-associated DNA damage*. Mol Cell Biol, 2011. **31**(21): p. 4379-89.
120. Falck, J., et al., *CDK targeting of NBS1 promotes DNA-end resection, replication restart and homologous recombination*. EMBO Rep, 2012.
121. Wohlbold, L., et al., *Chemical genetics reveals a specific requirement for cdk2 activity in the DNA damage response and identifies nbs1 as a cdk2 substrate in human cells*. PLoS Genet, 2012. **8**(8): p. e1002935.
122. Albuquerque, C.P., et al., *A multidimensional chromatography technology for in-depth phosphoproteome analysis*. Mol Cell Proteomics, 2008. **7**(7): p. 1389-96.
123. Smolka, M.B., et al., *Proteome-wide identification of in vivo targets of DNA damage checkpoint kinases*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(25): p. 10364-9.
124. Surana, U., et al., *The role of CDC28 and cyclins during mitosis in the budding yeast S. cerevisiae*. Cell, 1991. **65**(1): p. 145-61.
125. Li, X., et al., *Large-scale phosphorylation analysis of alpha-factor-arrested Saccharomyces cerevisiae*. J Proteome Res, 2007. **6**(3): p. 1190-7.

126. Amon, A., S. Irniger, and K. Nasmyth, *Closing the cell cycle circle in yeast: G2 cyclin proteolysis initiated at mitosis persists until the activation of G1 cyclins in the next cycle*. Cell, 1994. **77**(7): p. 1037-50.
127. Grandin, N. and M. Charbonneau, *Mitotic cyclins regulate telomeric recombination in telomerase-deficient yeast cells*. Mol Cell Biol, 2003. **23**(24): p. 9162-77.
128. Dosztanyi, Z., et al., *IUPred: web server for the prediction of intrinsically unstructured regions of proteins based on estimated energy content*. Bioinformatics, 2005. **21**(16): p. 3433-4.
129. Kinoshita, E., et al., *Phosphate-binding tag, a new tool to visualize phosphorylated proteins*. Mol Cell Proteomics, 2006. **5**(4): p. 749-57.
130. Garcia, B., E.J. Stollar, and A.R. Davidson, *The importance of conserved features of yeast actin-binding protein 1 (abp1p): the conditional nature of essentiality*. Genetics, 2012. **191**(4): p. 1199-211.
131. 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.
132. Pelliccioli, A., et al., *Activation of Rad53 kinase in response to DNA damage and its effect in modulating phosphorylation of the lagging strand DNA polymerase*. EMBO J, 1999. **18**(22): p. 6561-72.
133. Abraham, R.T., *Cell cycle checkpoint signaling through the ATM and ATR kinases*. Genes Dev, 2001. **15**(17): p. 2177-96.
134. Cortez, D., et al., *Requirement of ATM-dependent phosphorylation of brca1 in the DNA damage response to double-strand breaks*. Science, 1999. **286**(5442): p. 1162-6.
135. O'Neill, T., et al., *Utilization of oriented peptide libraries to identify substrate motifs selected by ATM*. J Biol Chem, 2000. **275**(30): p. 22719-27.
136. Kozlov, S.V., et al., *Involvement of novel autophosphorylation sites in ATM activation*. EMBO J, 2006. **25**(15): p. 3504-14.
137. Yu, Y., et al., *DNA-PK and ATM phosphorylation sites in XLF/Cernunnos are not required for repair of DNA double strand breaks*. DNA Repair (Amst), 2008. **7**(10): p. 1680-92.
138. Wohlbold, L. and R.P. Fisher, *Behind the wheel and under the hood: functions of cyclin-dependent kinases in response to DNA damage*. DNA Repair (Amst), 2009. **8**(9): p. 1018-24.

139. Boulton, S.J. and S.P. Jackson, *Identification of a Saccharomyces cerevisiae Ku80 homologue: roles in DNA double strand break rejoining and in telomeric maintenance*. Nucleic Acids Res, 1996. **24**(23): p. 4639-48.
140. Siede, W., et al., *The Saccharomyces cerevisiae Ku autoantigen homologue affects radiosensitivity only in the absence of homologous recombination*. Genetics, 1996. **142**(1): p. 91-102.
141. Berkovich, E., R.J. Monnat, Jr., and M.B. Kastan, *Assessment of protein dynamics and DNA repair following generation of DNA double-strand breaks at defined genomic sites*. Nat Protoc, 2008. **3**(5): p. 915-22.
142. Frank-Vaillant, M. and S. Marcand, *Transient stability of DNA ends allows nonhomologous end joining to precede homologous recombination*. Mol Cell, 2002. **10**(5): p. 1189-99.
143. Karathanasis, E. and T.E. Wilson, *Enhancement of Saccharomyces cerevisiae end-joining efficiency by cell growth stage but not by impairment of recombination*. Genetics, 2002. **161**(3): p. 1015-27.
144. Zhang, Y., et al., *Regulation of repair choice: Cdk1 suppresses recruitment of end joining factors at DNA breaks*. DNA Repair (Amst), 2009. **8**(10): p. 1235-41.
145. Lisby, M., et al., *Choreography of the DNA damage response: spatiotemporal relationships among checkpoint and repair proteins*. Cell, 2004. **118**(6): p. 699-713.
146. Buis, J., et al., *Mre11 regulates CtIP-dependent double-strand break repair by interaction with CDK2*. Nat Struct Mol Biol, 2012. **19**(2): p. 246-52.
147. Ahnesorg, P. and S.P. Jackson, *The non-homologous end-joining protein Nej1p is a target of the DNA damage checkpoint*. DNA Repair (Amst), 2007. **6**(2): p. 190-201.
148. Deriano, L., et al., *Roles for NBS1 in alternative nonhomologous end-joining of V(D)J recombination intermediates*. Mol Cell, 2009. **34**(1): p. 13-25.
149. Taylor, E.M., et al., *The Mre11/Rad50/Nbs1 complex functions in resection-based DNA end joining in Xenopus laevis*. Nucleic Acids Res, 2010. **38**(2): p. 441-54.
150. St-Pierre, J., et al., *Polo kinase regulates mitotic chromosome condensation by hyperactivation of condensin DNA supercoiling activity*. Mol Cell, 2009. **34**(4): p. 416-26.
151. Ratsima, H., et al., *Independent modulation of the kinase and polo-box activities of Cdc5 protein unravels unique roles in the maintenance of genome stability*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. **108**(43): p. E914-23.

152. 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.
153. Foiani, M., et al., *The B subunit of the DNA polymerase alpha-primase complex in Saccharomyces cerevisiae executes an essential function at the initial stage of DNA replication*. Mol Cell Biol, 1994. **14**(2): p. 923-33.
154. Field, J., et al., *Purification of a RAS-responsive adenylyl cyclase complex from Saccharomyces cerevisiae by use of an epitope addition method*. Mol Cell Biol, 1988. **8**(5): p. 2159-65.
155. Clark-Lewis, I., J.S. Sanghera, and S.L. Pelech, *Definition of a consensus sequence for peptide substrate recognition by p44mpk, the meiosis-activated myelin basic protein kinase*. J Biol Chem, 1991. **266**(23): p. 15180-4.
156. Stevenson, B.J., et al., *Constitutive mutants of the protein kinase STE11 activate the yeast pheromone response pathway in the absence of the G protein*. Genes Dev, 1992. **6**(7): p. 1293-304.
157. Teo, S.H. and S.P. Jackson, *Lif1p targets the DNA ligase Lig4p to sites of DNA double-strand breaks*. Curr Biol, 2000. **10**(3): p. 165-8.
158. Walker, J.R., R.A. Corpina, and J. Goldberg, *Structure of the Ku heterodimer bound to DNA and its implications for double-strand break repair*. Nature, 2001. **412**(6847): p. 607-14.
159. Lim, H.S., et al., *Crystal structure of the Mre11-Rad50-ATPgammA complex: understanding the interplay between Mre11 and Rad50*. Genes Dev, 2011. **25**(10): p. 1091-104.
160. 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.
161. Pearlman, S.M., Z. Serber, and J.E. Ferrell, Jr., *A mechanism for the evolution of phosphorylation sites*. Cell, 2011. **147**(4): p. 934-46.
162. Cicenas, J. and M. Valius, *The CDK inhibitors in cancer research and therapy*. J Cancer Res Clin Oncol, 2011. **137**(10): p. 1409-18.