



HAL
open science

Identification et analyse d'une mutation pathogénique séparation de fonction de RAD50

Marie Chansel da Cruz

► **To cite this version:**

Marie Chansel da Cruz. Identification et analyse d'une mutation pathogénique séparation de fonction de RAD50. Biologie moléculaire. Université Paris Cité, 2020. Français. NNT : 2020UNIP5152 . tel-04163317

HAL Id: tel-04163317

<https://theses.hal.science/tel-04163317v1>

Submitted on 17 Jul 2023

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Université de Paris

École doctorale **Bio Sorbonne Paris Cité (BioSPC) - ED562**

Laboratoire Institut IMAGINE, Dynamique du Génome et Système Immunitaire (DSGI)

Et Genomic Vision

Identification et analyse d'une mutation pathogénique séparation de fonction de RAD50

Par Marie CHANSEL DA CRUZ

Thèse CIFRE de doctorat de Biologie cellulaire et moléculaire

Dirigée par Patrick Revy

Présentée et soutenue publiquement le **16 Décembre 2020**

Devant un jury composé de :

Valérie Borde, Directrice de Recherche, Université Paris Sorbonne, Rapportrice
Stéphane Coulon, Directeur de Recherche, Université d'Aix-Marseille, Rapporteur
Patricia Kannouche, Directrice de Recherche, Université Paris Saclay, Examinatrice
Bernard Lopez, Directeur de Recherche, Université de Paris, Examineur
Patrick Revy, Directeur de Recherche, Université de Paris, Directeur de thèse

A Olivier, Armand et Edgar,
A notre famille et son avenir.

RESUME

Titre : Identification et analyse d'une mutation pathogénique séparation de fonction de RAD50.

Le complexe MRN (MRE11-RAD50-NBS1) est un des acteurs centraux de la réparation des cassures double brin de l'ADN. Nous avons identifié un patient présentant un retard du développement associé à une insuffisance médullaire et porteur de mutations bialléliques du gène *RAD50*. La première mutation conduit à un allèle nul tandis que la seconde (notée *RAD50*^{E1035Δ}) entraîne l'expression d'une protéine ayant perdu un unique résidu dans une des heptades répétées du domaine en bobine enroulée de RAD50. Une analyse phénotypique exhaustive démontre que *RAD50*^{E1035Δ} représente une mutation séparation de fonction qui perturbe les fonctions du complexe MRN garantissant la réparation, la réplication et la résection de l'ADN, sans pour autant affecter sa capacité d'activer ATM. Les résultats obtenus, confirmés par l'utilisation de protéines recombinantes purifiées, suggèrent que c'est l'activité nucléasique de MRE11 qui est affectée. L'expression ectopique de la forme sauvage de la protéine RAD50 dans les cellules du patient restaure les capacités de réparation et de réplication montrant un lien direct entre le phénotype observé et la mutation de *RAD50* portée par le patient. La mutation correspondante chez *Saccharomyces cerevisiae* entraîne un défaut de réparation et d'activation de la voie Tel1 (ATM) thermosensible extrêmement sévère. Cette étude démontre l'importance du domaine en bobine enroulée de RAD50 pour garantir la régulation de l'activité de résection de MRE11 au sein du complexe MRN.

Mots clefs : Recombinaison homologue, complexe MRN, RAD50, peignage moléculaire.

ABSTRACT

Title: Identification and analysis of a disease-causing separation of function mutation in RAD50.

The MRN complex (MRE11-RAD50-NBS1) plays a central role in response to DNA double-strand breaks. We identified a patient with developmental defects and bone marrow failure carrying biallelic *RAD50* mutations. One of the mutations creates a null allele while the other (noted $RAD50^{E1035\Delta}$) leads to the expression of a protein that has lost a single residue in one of the repeated heptad of the coiled-coil domain of RAD50. We show that $RAD50^{E1035\Delta}$ represents a separation-of-functions mutation that impairs the DNA repair, the DNA replication and the resection warranted by the MRN complex without affecting its ability to activate ATM. The results, confirmed by the analysis of purified recombinant proteins, suggest that $RAD50^{E1035\Delta}$ directly impacts the nuclease activity of MRE11. The ectopic expression of the wild type form of RAD50 complemented the defects observed in the patient's cells demonstrating the casual link between the phenotype and the *RAD50* mutations carried by the patient. The corresponding mutation in *Saccharomyces cerevisiae* caused severe thermosensitive defects in both DNA repair and Tel1^{ATM} dependent signaling. Collectively, this study emphasizes the importance of the RAD50 coiled-coil to regulate MRE11-dependent DNA end resection.

Keywords: Homologous recombination, MRN complex, RAD50, molecular combing.

REMERCIEMENTS

Merci aux membres du jury qui ont accepté de juger ce travail. Il est le fruit de 4 années fortes en émotion !

Un grand merci à mon directeur de thèse, Patrick Revy, pour ta confiance, ton investissement, tes conseils et la patience dont tu as dû et su faire preuve avec moi. Merci à Jean-Pierre de Villartay, qui m'a recrutée en tant qu'ingénieure fraîchement diplômée, m'a formée, puis lancée sur la voie de la thèse. 10 années riches partagées !

Merci à tous les collaborateurs de Genomic Vision pour leur accueil et leur gentillesse.

Je remercie tous les membres de l'équipe du laboratoire DGSI. Les anciens et les nouveaux ! En 10 ans on voit passer du monde ! Les blagues de Vincent me manqueront, il faut bien que je le reconnaisse, je les adore ! Avec Laëtitia je crois que nous aurons partagé plus qu'un bureau et une paillasse. Quel plaisir ! Je te souhaite beaucoup de réussite. Je remercie également Emilie Lesport. Arrivées dans un grand labo vide, nous avons vite occupé 4 paillasses chacune sans trouver que c'était trop ! Tu m'as beaucoup appris et transmis les bases de ta rigueur scientifique qui ont participées à la réussite de cette aventure. Un grand merci également à Loélia et Anna qui auront complété l'équipe du bureau 302 de la plus belle des manières. On aime toujours plus vivre à Montrouge !

Merci à Nathalie du CEDI pour tes conseils qui sont toujours les bons, qu'il s'agisse de PCR ou de robe de mariée !

Erika, Despina, Tanguy, Paola, Laurent, Laetitia, Gabriella, Shu, Aurélien, Sophie, Maname, Benoît, Benoît, Stefania, Satish, Aurélie, Mounia, Elisa, Marta, Alice, Alexis, Lucile, merci à chacun d'avoir participé de près ou de loin à ce travail.

Merci aussi à la biscuiterie Saint Michel pour ses madeleines aux pépites de chocolat du vendredi.

Je remercie mes fidèles amies depuis 10 ans au moins, 30 ans au plus, Pauline, Sophie, Stéphanie et Béatrice. Cette thèse c'est aussi une histoire de famille. Un immense merci à mes parents qui nous ont donné confiance, encouragé et montré que le plus important finalement c'est d'aimer ! Avec ces valeurs, vous avez construit autour de vous une véritable team, un crew auquel je suis très fière d'appartenir avec Julien et Lucie, mon frère et ma sœur et toute leurs familles. Merci infiniment à vous tous.

Pour finir, le plus grand des mercis à mon incroyable mari, Olivier. Merci pour ton amour, ta confiance, ton soutien et tes encouragements. Tu auras su trouver les arguments (pas toujours très honnêtes !) pour que je n'abandonne pas et écouté avec attention mes 200 projets de carrière à venir ! Ça y est, ta femme ne sera plus étudiante ... quoi que ?! Tu es aussi celui qui m'aura permis de devenir ce que je préfère être : maman. Maman de deux adorables garçons qui remplissent de bonheur mes jours (et parfois mes nuits) et que nous accompagnons de notre mieux dans leur développement et dans leur épanouissement personnel. Mes garçons, je vous souhaite la liberté d'être qui vous êtes et d'en être fiers. Je vous aime tellement.

LISTE DES PRINCIPALES ABREVIATIONS

ADN : Acide Désoxyribonucléique

ADNsb : ADN simple brin

a-NHEJ : Alternative Non Homologous End Joining - Jonction alternative d'extrémités non homologues

ATLD : Ataxia Telangiectasia Like Disorder

ATM : Protéine Ataxia-Telangiectasia Mutated

ATP : Adénosyne Triphosphate

ATR : Protéine Ataxia-Telangiectasia Rad3-Related

CPT : Camptothécine

CSR : Class Switch Recombination - commutation isotypique

DDR : DNA damage response - Réponse aux dommages de l'ADN

KO : Knock-Out

MEFs : Mouse Embryonic Fibroblasts - Fibroblastes embryonnaires murins

MMEJ : Microhomology-Mediated End Joining

MMS : Méthyl-Méthane Sulfonate

MR : Complexe MRE11-RAD50

MRN : Complexe MRE11-RAD50-NBS1

NBS : Nijmegen Breakage Syndrome

NHEJ : Non Homologous End Joining – jonction d'extrémités non homologues

Pb : Paire de Base

RH : Recombinaison Homologue

SMART : Single-Molecule Analysis of Resection Tracks

SOMMAIRE

CONTEXTE ET OBJECTIFS DE LA THESE	p.12
INTRODUCTION	p.13
<i>Chapitre I : Dynamique du génome et réparation de l'ADN</i>	<i>p.13</i>
I.1 <u>Dynamique du génome</u>	p.13
I.1.1 <i>Exemple du système immuno-hématopoïétique</i>	<i>p.13</i>
I.1.2 <i>Modifications programmées de l'ADN dans le système immunitaire</i>	<i>p.14</i>
I.2 <u>Dommmages à l'ADN et réponse</u>	p.15
I.3 <u>Les systèmes de réparation de l'ADN</u>	p.17
I.3.1 <i>La jonction d'extrémités non homologues (NHEJ)</i>	<i>p.17</i>
I.3.1.1 Généralités	
I.3.1.2 Mode opératoire	
I.3.1.3 Voie alternative du NHEJ	
I.3.2 <i>La recombinaison homologe (RH)</i>	<i>p.21</i>
I.3.2.1 Généralités	
I.3.2.2 Mode opératoire	
I.3.2.3 Recombinaison homologe et réplication	
- Protection	
- Redémarrage	
- Réparation des lésions post réplcatives	
<i>Chapitre II : Le complexe MRN</i>	<i>p.30</i>
II.1 <u>Description</u>	p.30
II.1.1 <i>Généralités</i>	<i>p.30</i>
II.1.2 <i>MRE11</i>	<i>p.33</i>
II.1.3 <i>NBS1</i>	<i>p.36</i>
II.1.4 <i>RAD50</i>	<i>p.38</i>
II.1.4.1 Généralités	
II.1.4.2 Le crochet de zinc (zinc hook)	
II.1.4.3 Le domaine en bobine enroulée (coiled-coil domain)	
II.1.5 <i>Modèles</i>	<i>p.42</i>
II.1.5.1 Dimérisation intra ou inter moléculaire	
II.1.5.2 Hydrolyse de l'ATP et changements conformationnels	
II.2 <u>Activités biologiques</u>	p.47
II.2.1 <i>MRN et réparation</i>	<i>p.47</i>
II.2.1.1 Détection	
II.2.1.2 Signalisation	
II.2.1.3 Actions et régulation	
II.2.1.4 Rapprochement	
II.2.2 <i>MRN et réplication</i>	<i>p.52</i>
II.2.3 <i>MRN et réponse immunitaire innée</i>	<i>p.52</i>
II.2.4 <i>MRN et télomères</i>	<i>p.53</i>

II.2.5 <i>MRN et maladies</i>	p.55
II.2.5.1 Chez l'homme	
- Mutations génétiques dans un des facteurs du complexe MRN	
- Complexe MRN et cancers	
II.2.5.2 Modèles murins	
 Chapitre III : Le peignage moléculaire	 p.59
III.1 <u>Généralités, principe</u>	p.59
III.2 <u>Applications</u>	p.60
III.2.1 <i>Hybridation in situ</i>	p.60
III.2.2 <i>Etude de la réplication</i>	p.60
III.2.3 <i>Etude de la résection</i>	p.61
III.2.4 <i>Mesure de la taille des télomères</i>	p.63
 ARTICLE	 p.64
 MATERIEL ET METHODES	 p.100
<i>I : Etude de l'instabilité chromosomique dans les cellules du patient</i>	<i>p.100</i>
<i>II : Etude de la réparation dans les cellules du patient</i>	<i>p.100</i>
II.1 <u>Western Blot FANCD2</u>	p.100
II.2 <u>Foci 53BP1 post phléomycine</u>	p.101
II.3 <u>Test de la voie NHEJ</u>	p.101
II.4 <u>Analyse PROMIDISα</u>	p.102
II.5 <u>SMART</u>	p.103
II.6 <u>Immunofluorescence Ku80</u>	p.103
<i>III : Génération de souris Rad50^{E1035Δ}</i>	<i>p.104</i>
 RESULTATS	 p.106
<i>I : Etude de l'instabilité chromosomique dans les cellules du patient</i>	<i>p.106</i>
<i>II : Etude de la réparation dans les cellules du patient</i>	<i>p.106</i>
II.1 <u>Ubiquitination de FANCD2</u>	p.106
II.2 <u>Analyse des foyers 53BP1 induits par la phléomycine</u>	p.107
II.3 <u>Analyse de la religation de plasmides linéarisés</u>	p.108
II.4 <u>Analyse du répertoire TCRα par PROMIDISα</u>	p.109
II.5 <u>Analyse de la génération d'ADN simple brin par la technique du SMART</u>	p.111
II.6 <u>Détection de foyers Ku aux extrémités d'ADN générées par la CPT</u>	p.113
<i>III : Autres modèles</i>	<i>p.115</i>
III.1 <u>Analyse des souris RAD50^{E1035Δ}</u>	p.115
III.2 <u>Analyses des levures</u>	p.118

III.2.1 <i>Délétion d'une heptade</i>	p.118
III.2.2 <i>Sporulation</i>	p.118
III.2.3 <i>Test d'un effet négatif dominant de la mutation rad50^{E1042Δ}</i>	p.119
DISCUSSION ET PERSPECTIVES	p.121
<i>I : Un patient RAD50^{E1035Δ} au génotype et phénotype singuliers</i>	<i>p.121</i>
I.1 <u>RAD50^{E1035Δ} une mutation rare</u>	p.121
I.2 <u>Des symptômes proches des patients ATLD ou NBS</u>	p.121
I.3 <u>Mutation RAD50^{E1035Δ} hypomorphe</u>	p.122
<i>II : Impacts de la mutation RAD50^{E1035Δ} sur l'activité du complexe MRN</i>	<i>p.123</i>
<u>II.1 Etude de différents modèles eucaryotes</u>	p.123
II.1.1 <i>Chez la levure</i>	
II.1.2 <i>Modèle murin</i>	
<u>II.2 RAD50^{E1035Δ} et activité nucléasique de MRE11</u>	p.126
<i>III : Mutation séparation de fonction</i>	<i>p.126</i>
<i>IV : Modélisation de l'impact de la mutation RAD50^{E1035Δ}</i>	<i>p.128</i>
<i>V : Remarques conclusives</i>	<i>p.130</i>
ANNEXE	p.131
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	p.132
TABLE DES ILLUSTRATIONS	p.142

CONTEXTE ET OBJECTIFS DE LA THESE

Le laboratoire Dynamique du Génome et Système Immunitaire (DGSI) de l'Institut Imagine (unité INSERM U1163, Paris) codirigé par Jean-Pierre de Villartay et Patrick Revy, vise à étudier les mécanismes de réparation de l'ADN dans des contextes de pathologies humaines. Pour ce faire, des patients présentant des caractéristiques cliniques évoquant un défaut de réparation de l'ADN sont adressés et analysés au laboratoire. Ainsi, en observant le phénotype altéré de leurs cellules et en déterminant leurs génotypes, des informations sur les protéines et gènes impliqués dans la réparation peuvent être obtenues. Le but de cette approche est de mettre en évidence de nouveaux facteurs impliqués dans les mécanismes de réparation de l'ADN ou de préciser les fonctions de facteurs déjà connus.

D'autre part, l'entreprise Genomic Vision a mis au point et commercialise la méthode du peignage moléculaire (molecular combing). Cette dernière permet de visualiser à l'échelle moléculaire des fibres d'ADN qui, une fois peignées, peuvent être pré-marquées et/ou hybridées avec une association de sondes spécifiques. De grands réarrangements génétiques peuvent être détectés et des informations sur les paramètres de réplication sont, via cette technique, accessibles. La détection et l'analyse des signaux résultant du peignage moléculaire ont été automatisées par l'utilisation d'un scanner (FiberVision®) couplé à un système autonome de détection (logiciel FiberStudio®).

Une collaboration entre le laboratoire DGSI et Genomic Vision a été établie au travers de cette thèse CIFRE, dans le but de développer de nouvelles approches, à partir du peignage moléculaire et au moyen des outils proposés par Genomic Vision, afin d'étudier la réparation et la réplication de l'ADN dans un contexte de pathologie humaine. Pour ce faire, un patient présentant des symptômes cliniques évoquant des défauts de réparation de l'ADN a été analysé.

INTRODUCTION

CHAPITRE I : Dynamique du génome et réparation de l'ADN

I.1 Dynamique du génome

I.1.1 *Exemple du système immuno-hématopoïétique*

Le génome est une structure dynamique, évoluant par mutations ponctuelles et grands réarrangements chromosomiques. Cette dynamique participe à l'évolution des populations. Néanmoins, la conservation de l'information génétique est indispensable à la perpétuation des espèces et, au niveau de l'individu, une trop grande dynamique est responsable de l'étiologie de nombreuses maladies et notamment de l'apparition de cancers. C'est pourquoi les cellules eucaryotes se sont dotées de système de surveillance, de détection, de signalisation et de réparation de l'ADN afin de garantir la stabilité et la fidélité du génome.

Le système immunitaire comprend l'ensemble des cellules et composés moléculaires spécialisés dans la détection et l'élimination d'antigènes, éléments considérés comme étrangers à l'organisme. Il est indispensable à la survie puisqu'une absence totale de certaines cellules immunitaires telles que les lymphocytes B et T, entraîne un déficit immunitaire combiné sévère létal sans traitement par greffe de cellules souches hématopoïétiques ou par thérapie génique (**Cavazzana-Calvo et al., 2001, J Gene Med**). Les cellules immunitaires sont issues de l'hématopoïèse, regroupant l'ensemble des mécanismes impliqués dans la production des cellules du sang à partir de cellules souches hématopoïétiques multipotentes (**Blom et Spits, 2006, Annu Rev Immunol**). Une cellule souche hématopoïétique multipotente peut se différencier en progéniteur puis précurseur commun myéloïde aboutissant à la production des polynucléaires, monocytes, plaquettes et hématies ; ou en progéniteur puis précurseur commun lymphoïde qui engage la cellule vers la lignée lymphoïde pour la production des lymphocytes B, T et NK (**Ye et Graf, 2007, Curr Opin Immunol**). Ce processus physiologique dynamique et continu assure la production quotidienne de 10 000 milliards de cellules sanguines. Pour ce faire, les cellules souches hématopoïétiques ont une haute capacité proliférative avant de subir de nombreuses étapes de différenciation cellulaire. Cette association de prolifération / maturation implique

inévitablement des dommages aléatoires de l'ADN (**Chaplin, 2003, J Allergy Clin Immunol**) comme en témoignent les récents travaux rapportant l'accumulation de mutations somatiques et d'altérations chromosomiques dans les cellules du sang chez des individus sains au cours du temps (**Lee-Six et al., 2018, Nature ; Osorio et al., 2018, Cell Report ; Loh et al., 2018, Nature ; Terao et al., 2020, Nature**). Par ailleurs, le développement de certaines cellules du système immunitaire (i.e. les lymphocytes T et B) nécessite des modifications programmées du génome qui requièrent l'utilisation de voies de réparation de l'ADN. Le système immuno-hématopoïétique apparaît donc comme un modèle d'étude de choix pour l'analyse des conséquences des dommages de l'ADN et de leurs prises en charge par les voies de réparation.

I.1.2 Modifications programmées de l'ADN dans le système immunitaire

Chez les mammifères, le système immunitaire est en mesure de reconnaître une grande variété de pathogènes dans le but d'initier une réponse rapide et efficace. Pour créer la diversité et la spécificité nécessaires, des modifications génomiques successives sont utilisées : la recombinaison V(D)J, la commutation de classe des immunoglobulines et la production d'hypermutations somatiques des chaînes variables des immunoglobulines.

Au cours de la recombinaison V(D)J, après cassures double brin induites par des endonucléases spécifiques (le complexe RAG1-RAG2), des réarrangements programmés de segments géniques permettent la production d'une grande diversité d'immunoglobulines dans les lymphocytes B et de récepteurs aux antigènes à la surface des lymphocytes T (**Alt et al., 2013, Cell**). La commutation de classe des chaînes lourdes des immunoglobulines (Class Switch Recombination ou commutation isotypique) permet le changement du type d'immunoglobulines sécrétées sans affecter la spécificité de liaison à l'antigène, favorisant ainsi une réponse immunitaire adaptée. Elle implique la création de cassures double brin ciblées à des loci spécifiques (les régions switch S) initiée par des déaminations de cytidines par l'enzyme AID (activation-induced cytidine deaminase) suivie de la recombinaison de l'ADN entre des régions S. Finalement, les hyper-mutations somatiques des régions variables des immunoglobulines (Somatic Hyper-Mutation, SHM) permettent de modifier l'affinité des anticorps au fur et à mesure que la réponse immunitaire progresse. Des cytidines des gènes codants les parties variables des immunoglobulines sont désaminées en uracile par l'enzyme AID puis réparées par des voies de réparation mutagènes (**Methot et Di Noia, 2017, Adv Immunol**).

Il existe donc un lien étroit entre le système immunitaire et les systèmes de réparation de l'ADN. Des défauts de réparation de l'ADN au cours de ces processus peuvent provoquer des translocations à l'origine de leucémies et lymphomes (**Gostissa *et al.*, 2011, Annu Rev Immunol**).

I.2 Dommmages à l'ADN et réponse

L'ADN est une molécule pouvant subir des dommages issus de diverses sources exogènes (rayons UV, radiations ionisantes, composés chimiques) et endogènes programmées (recombinaison V(D)J, commutation des immunoglobulines) ou non (espèce réactive de l'oxygène, ROS, par exemple). Afin d'éviter les conséquences délétères que pourraient avoir ces dommages, en particulier en propageant ces dommages aux cellules filles, les cellules sont dotées de systèmes sophistiqués tels que la réparation de l'ADN, l'activation de point de contrôle lors du cycle cellulaire ou encore l'induction de la mort cellulaire (**Chatterjee et Walker, 2017, Environmental and Molecular Mutagenesis**).

Dans les cellules cancéreuses ces systèmes sont dérégulés, augmentant ainsi l'instabilité génomique et favorisant la progression de la maladie (**Bouwman and Jonkers, 2012, Nature Review Cancer**).

Lorsque l'ADN est endommagé, la réponse au dommage de l'ADN est engagée (DNA damage response, DDR) et la réparation peut être initiée. La DDR comprend le recrutement de protéines senseurs, le signalement de la présence d'un dommage et l'initiation de la réparation (Figure 1). La réparation de l'ADN est effectuée selon cinq voies principales : l'excision de base (base excision repair, BER), l'excision de nucléotide (nucleotide excision repair, NER), la réparation des mésappariements (mismatch repair, MMR), la recombinaison homologue (RH, homologous recombination) et la jonction d'extrémités non homologues (non homologous end joining, NHEJ). Elles interviennent à différents stades du cycle cellulaire, après des cassures simple ou double brin de l'ADN ou des modifications de nucléotides.

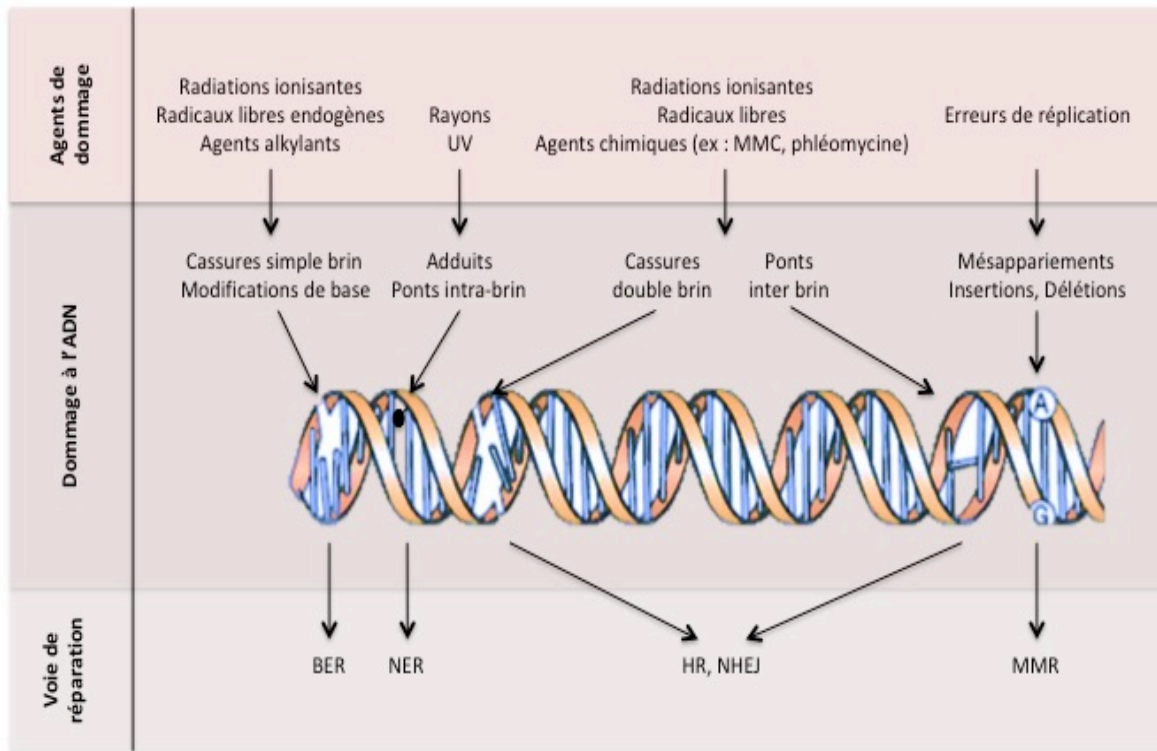


Figure 1 : Dommages à l'ADN et voies de réparation impliquées. UV : Ultraviolet, MMC : Mitomycine C, BER : Réparation par excision de base, NER : Réparation par excision de nucléotides, HR : Recombinaison homologue, NHEJ : Jonction d'extrémités non homologues, MMR : Réparation des mésappariements.

Les cassures double brin constituent un des dommages à l'ADN les plus toxiques pour la cellule. Menaçant l'intégrité du génome, elles sont à l'origine de réarrangements chromosomiques, dérégulant la structure et la fonction des gènes et étant une étape primaire de transformation des cellules dans de nombreux cancers humains. Pouvant apparaître de manière spontanée dans la cellule durant la réplication ou la méiose, elles sont également des intermédiaires de réactions enzymatiques indispensables à la vie (recombinaison méiotique ou recombinaison VDJ). Toutefois, elles peuvent aussi être provoquées par des sources externes à la cellule, comme après une exposition aux radiations ionisantes ou à des agents chimiques génotoxiques (traitement thérapeutique des cancers, bleomycine par exemple). Les cassures double brin sont prises en charge par deux systèmes majeurs de réparation : la jonction d'extrémités non homologues (NHEJ) et la recombinaison homologue (RH). Des mutations germinales affectant des gènes codant des facteurs impliqués dans la réparation des cassures double brin de l'ADN provoquent de nombreuses maladies héréditaires caractérisées par une instabilité génomique, des déficits immunitaires, une prédisposition aux cancers, des troubles du développement et un vieillissement prématuré (syndrome de Werner (**Werner, 1985** ;

Oshima et al., 2017, Ageing Research Reviews), syndrome de Bloom (**Bloom, 1954 ; Schoenaker et al., 2018, J Clin Immunol**) ou syndrome de Nijmegen (**Weemaes et al., 1981, Acta Paediatr Scand**) par exemple).

I.3 Les systèmes de réparation de l'ADN

I.3.1 *La jonction d'extrémités non homologues - Non Homologous End Joining (NHEJ)*

I.3.1.1 Généralités

Le NHEJ est un système de réparation particulièrement conservé au cours de l'évolution. Rapide, efficace mais infidèle, il permet de lier deux extrémités d'ADN voisines quelle que soit la nature des séquences impliquées. Il peut en résulter des délétions, insertions, substitutions ou même des translocations. Actif tout au long du cycle cellulaire, il est cependant favorisé en phase G0/G1 et en début de phase S grâce à 53BP1 (**Lieber, 2010, Annu Rev Biochem**). Cette protéine favorise le NHEJ et des délétions de 53bp1 chez la souris entraînent un défaut de NHEJ et favorisent la réparation par RH. D'autre part, BRCA1 en interaction avec CtIP joue un rôle important dans la promotion de la RH. En phase G1, 53BP1 restreint l'accumulation de BRCA1 et phosphoryle RIF1 qui s'accumule au site de cassure, favorisant ainsi le NHEJ. En phase S/G2, le complexe BRCA1-CtIP supprime l'accumulation de RIF1, permettant la RH (**Escribano-Diaz et al., 2013, Mol Cell**).

I.3.1.2 Mode opératoire

Sous sa forme classique (cNHEJ), le système est initié par la fixation de l'hétérodimère KU70-KU80 (Ku), possédant une grande affinité pour les extrémités d'ADN à bouts francs ou avec de courtes séquences simple brin (Figure 2) (**Blier et al., 1993, The Journal of Biological Chemistry**). Ku agit comme une protéine de chargement sur laquelle d'autres protéines du NHEJ peuvent être recrutées. Ainsi, une fois fixé, Ku recrute DNA-PKcs (DNA-dependent protein kinase catalytic subunit) qui s'active par autophosphorylation (**Goodarzi et al., 2006, EMBO**). L'association Ku/DNA-PKcs forme le complexe DNA-PK qui crée une synapse dans laquelle les extrémités d'ADN se rapprochent pour être modifiées par des nucléases afin d'assurer leur compatibilité (**Graham et al., 2016, Mol Cell**). En effet, la

plupart des cassures double brin ont deux extrémités d'ADN incompatibles, pour cause de modifications chimiques ou d'extrémités sortantes inadaptées, qui empêchent la ligature directe. Dans ce cas, l'activité nucléasique (ou résection) effectuée par des protéines dédiées assure la compatibilité des extrémités. Dans le NHEJ, cette résection des extrémités implique la dégradation de petits fragments d'ADN afin de générer et d'exposer de très courtes séquences de microhomologie d'une longueur allant jusqu'à quatre nucléotides. Parmi les nucléases impliquées, on retrouve principalement Artemis (**Moshous *et al.*, 2001, Cell**). Toutefois, d'autres nucléases et facteurs de modifications pourraient contribuer aux modifications des extrémités d'ADN comme PNKP (polynucleotides kinase-phosphatase), FEN1 (flap endonuclease 1), CtIP (CtBP-interacting protein), WRN (Werner syndrome ATP-dependent helicase), EXO1 (exonuclease 1) ou encore le complexe MRN (MRE11-NBS1-RAD50) (**Pannunzio *et al.*, 2014, DNA Repair**). Ce dernier pourrait de plus aider au rapprochement des extrémités à lier (**Scully *et al.*, 2009, Nat.Struct. Mol. Biol** et **Williams *et al.*, 2008, Cell**).

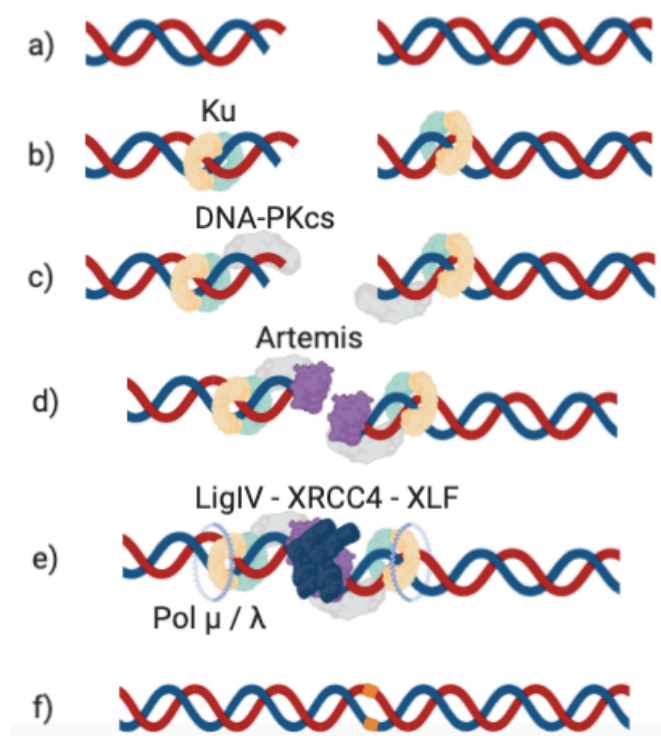


Figure 2 : La jonction d'extrémités non homologues (Non Homologous End Joining - NHEJ). a) Formation d'une cassure double brin. b) L'hétérodimère Ku70/Ku80 (Ku) se fixe à la cassure. c) La sous-unité catalytique de la protéine kinase de l'ADN (DNA-protein kinase catalytic subunit – DNA-PKcs) interagit avec Ku pour former le complexe DNA-PK. d) Chargement de nucléases afin d'assurer la compatibilité des extrémités. e) Ligation des extrémités d'ADN par le complexe XRCC4-XLF-DNALigIV. f) ADN réparé mais présentant de potentielles erreurs (délétions, insertions, substitutions par exemple).

Le complexe MRN est considérablement moins abondant que les protéines Ku dont l'affinité pour les extrémités d'ADN est très grande. MRN est donc moins susceptible de se lier aux extrémités d'ADN double brin. De plus, la présence de Ku empêche la résection sur de longues distances, suggérant ainsi un rôle limité de MRN dans la jonction d'extrémités lorsque Ku est présent. Toutefois, des études *in vitro* montrent que la fonction endonucléasique de MRN serait capable d'enlever les adduits protéiques des extrémités d'ADN (dont Ku, cf partie I.3.2.3), suggérant un potentiel rôle du complexe MRN et de son partenaire CtIP dans un ensemble de réactions secondaires du NHEJ (**Deshpande et al., 2016, Mol Cell**).

La polymérisation de l'ADN est ensuite assurée par les polymérases Pol mu et lambda de manière dépendante ou non de la séquence nucléotidique à copier, avant la ligation des extrémités via le complexe formé par l'association de l'ADN Ligase IV (LIG4) avec les protéines de structure associées XRCC4 (X-ray repair cross-complementing protein 4), XLF (XRCC4-like factor, également appelé Cernunnos) et PAXX (paralogue of XRCC4 and XLF). Artemis possède un domaine d'interaction avec DNA Ligase IV (**Malu et al., 2012, J. Exp. Med**) dont la stabilité et la fonction sont assurées par XRCC4. XLF et PAXX ont pour leur part des activités de maintien partiellement redondantes. Le recrutement de ces différents acteurs est assuré par DNA-PK (**Pannunzio et al., 2018, J Biol Chem**).

La jonction d'extrémités non homologues à bouts francs ne possédant pas de microhomologie ne peut être efficace qu'en la présence de Ku. Au contraire, la ligation d'extrémités possédant de la microhomologie ne nécessite pas inévitablement Ku, montrant l'importance de Ku dans le processus de ligation d'extrémités incapables de réaliser un appariement de bases.

I.3.1.3 Voie alternative du NHEJ

Il existe une voie alternative au NHEJ (a-NHEJ) qui contribue peu à la réparation des cassures double brin. Toutefois, elle est de plus en plus étudiée car source de grandes délétions, de translocations et de réarrangements chromosomiques souvent observés dans les cellules cancéreuses (**Sallmyr and Tomkinson, 2018, JBC**). Cette voie est indépendante de Ku et initiée par une étape de résection mettant en évidence des séquences homologues. L'alignement de ses dernières permettra une jonction et une ligation efficaces. Également appelée MMEJ (microhomology-mediated end joining) ou Pol thêta mediated end-joining, la

voie du a-NHEJ nécessite au point de cassure la présence de séquences homologues couramment comprises entre 2 et 6 nucléotides. Elle repose sur l'utilisation de la poly (ADP-ribose) polymérase 1 (PARP1) qui détecte la cassure, de l'activité exonucléasique de MRE11 du complexe MRN stimulée par CtIP pour générer des extrémités 3' sortantes de 15 à 100 nucléotides et de la polymérase pol thêta (**Black *et al.*, 2019, Nat Commun**) qui stabilise l'alignement de deux brins 3' sortant via une petite homologie de 2 nucléotides et réalise l'élongation des brins. Le complexe DNA ligase III/XRCC1 permet ensuite la ligation des brins (Figure 3).

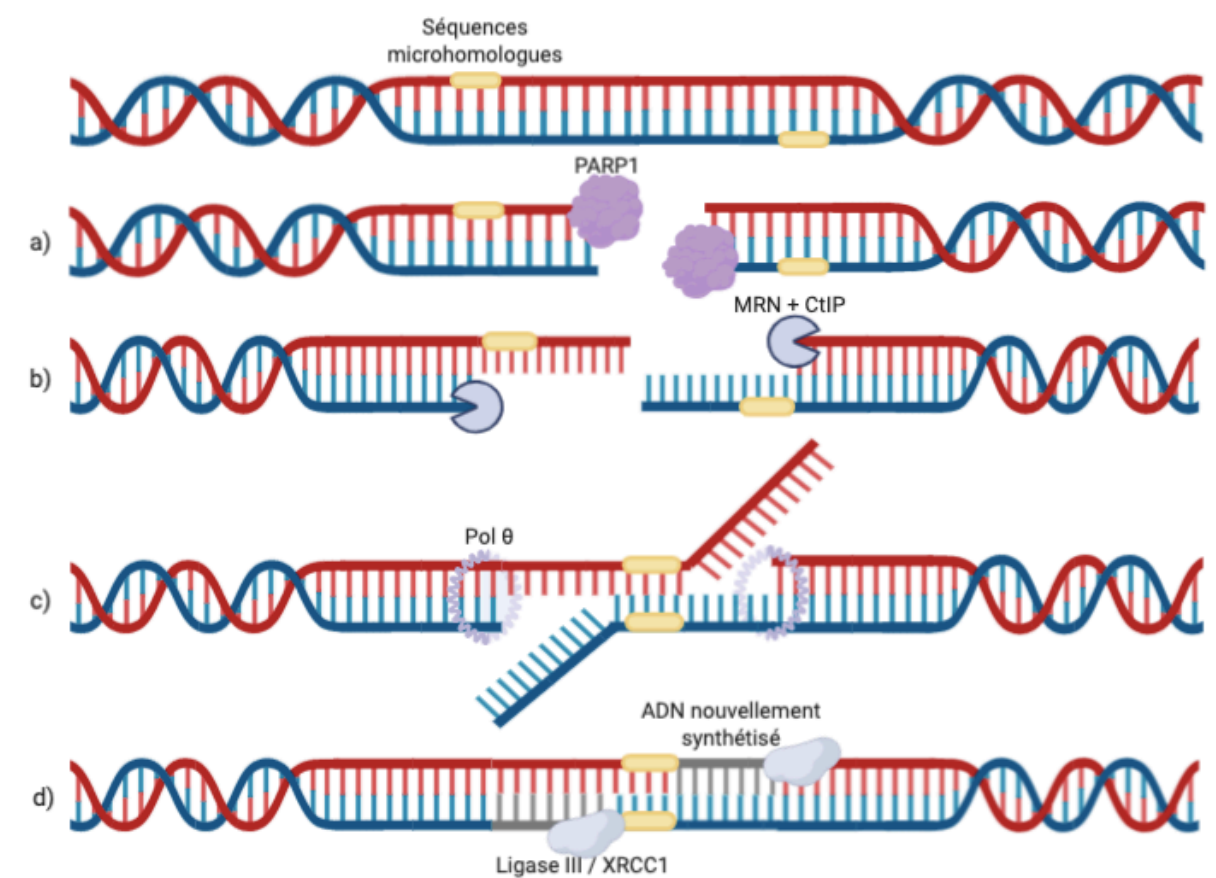


Figure 3 : Mécanisme de jonction d'extrémités non homologues alternatif (alternative Homologous End Joining - a-NHEJ). a) Après une cassure double brin et en présence de séquences microhomologues, fixation de PARP1. b) Résection assurée par l'activité exonucléasique de MRE11. c) Appariement des deux brins sortant sur les séquences microhomologues puis polymérisation. d) Ligation des brins nouvellement synthétisés par le complexe Ligase III / XRCC1.

I.3.2 La recombinaison homologue (RH)

I.3.2.1 Généralités

Contrairement au NHEJ, la RH nécessite des séquences homologues entre l'ADN endommagé et un ADN donneur qui servira de modèle pour l'étape clé de synthèse d'un nouveau brin. Voie de réparation fidèle, la RH intervient durant les phases S et G2 du cycle cellulaire lorsqu'une chromatide sœur pouvant servir de matrice est disponible (**Hustedt et Durocher, 2017, Nature Cell Biology**).

Chez la levure, des mutations dans les gènes codant des protéines intervenant dans la voie de réparation par RH (Rpa ou Rad51 par exemple) induisent des phénotypes d'extrême sensibilité aux agents génotoxiques provoquant des cassures double brin (**Cox et Game, 1974, Mutat Res**). Chez l'homme, des mutations dans des facteurs impliqués dans la RH sont intimement liées au risque de cancer, notamment parce qu'il fait intervenir les protéines BRCA1 et BRCA2 retrouvées mutées dans les formes héréditaires du cancer des ovaires et du sein (**Moynahan and Jasin, 2010, Nat Rev Mol Cell Biol**).

La recombinaison homologue permet la réparation des cassures double brin en phase S/G2, le maintien d'une réplication efficace et assure durant la méiose le brassage génétique garantissant la diversité génétique (**Hunter, 2015, Cold Spring Harb Perspect Biol**).

I.3.2.2 Mode opératoire

La recombinaison homologue s'opère en quatre étapes clés (**San Filippo et al., 2008, Annu Rev Biochem**) (Figure 4) :

- (i) Résection d'un des brins dans le sens 5'-3' de part et d'autre de la cassure, libérant ainsi une extrémité 3'OH simple brin (ADNsb) (**Wright et al., 2018, JBC**),
- (ii) Invasion par l'ADN simple brin sortant au sein de l'ADN double brin complémentaire homologue et formation d'une boucle en D,
- (iii) Extension de l'extrémité 3' envahissante par synthèse d'ADN avec pour matrice le brin envahi,
- (iv) Résolution de la structure par différents mécanismes (hybridation/ligation, résolution de jonctions de Holliday).

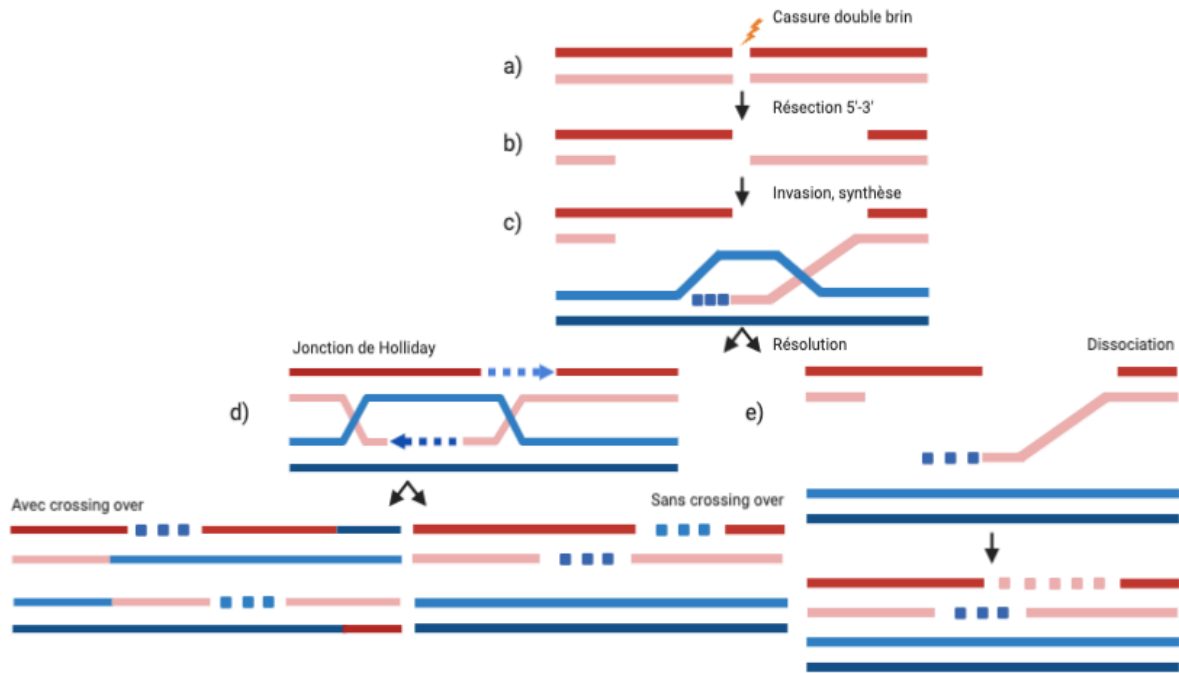


Figure 4 : La recombinaison homologue. a) Après cassure double brin résection par le complexe MRN de part et d'autre de la cassure (b). c) Invasion de brin, hybridation par homologie de séquences, synthèse d'ADN et formation d'une boucle D. Résolution de la structure soit par formation d'une double jonction de Holliday avec crossing over ou non (d) soit par dissociation du brin néo synthétisé (e).

Après reconnaissance d'une extrémité d'ADN double brin (ou d'une cassure double brin), la résection est initiée par le complexe MRN (MRE11, RAD50, NBS1) associé à son partenaire CtIP, lui-même activé par BRCA1 (Sartori *et al.*, 2007, Nature). Le recrutement de MRN permet l'activation d'ATM (Lee and Paull, 2004, Science). Au sein de ce complexe, l'activité endonucléasique de la protéine MRE11 permet de couper le brin 5' à environ 300 nucléotides de la cassure. MRE11 possède également une activité exonucléasique 3'-5' permettant d'étendre la coupure (Garcia *et al.*, 2011, Nature). Cette première étape permettra de déplacer KU70/KU80 et DNAPKcs (Chanut *et al.*, 2016, Nature Communications ; Deshpande *et al.*, 2020, Science Advances) de l'extrémité de l'ADN afin de libérer l'espace nécessaire à l'action de nucléases permettant une résection plus longue assurée par EXO1 ou DNA2 (Nimonkar *et al.*, 2011, Genes Dev). L'ADN simple brin émergent est rapidement recouvert par la protéine RPA (Replication Protein A), l'empêchant de former des structures secondaires, d'être dégradé ou de s'hybrider avec d'autres ADN simple brin (Li *et al.*, 2019, Curr Genet).

BRCA2 est un médiateur de la recombinaison car il est capable de (i) s'accrocher à l'ADN simple brin, (ii) se lier physiquement à la recombinase RAD51 et (iii) faciliter son recrutement aux séquences simple brin via le déplacement de RPA (**Yang et al., 2005, Nature**). PALB2 a été identifié comme étant un deuxième médiateur, capable d'interagir avec BRCA2 (**Nepomuceno et al., 2017, Int J Mol Sci**). Par la présence de BRCA2 et sous l'activation de DSS1, le décrochage de RPA est facilité et progressivement remplacé par RAD51 (**Liu et al., 2010, Nat Struct Mol Biol**). Une fois assemblé par nucléation, le nucléofilament hélicoïdale RAD51-ADNsb recherche des régions d'homologie (**Brouwer et al., 2018, EMBO**). Lorsque l'homologie de séquence est suffisante (environ 100 nucléotides), une synapse stabilisée est créée. Le brin non complémentaire de l'ADN envahi est déplacé par l'activité de RAD54 (**Van Komen et al., 2000, Mol Cell**), formant ainsi une boucle de déplacement (D-loop, displacement loop). Ce processus est médié par le duplex BRCA1-BARD1 et par l'hydrolyse de l'ATP porté par RAD51 entraînant le désassemblage de RAD51 du filament (**Zhao et al., 2017, Nature**). La queue 3' envahissante est allongée par synthèse d'ADN avec pour matrice le brin envahi. Si un seul brin a envahi l'ADN homologue complémentaire, la structure est résolue par déplacement du brin néo synthétisé puis rapprochement avec la seconde extrémité de la cassure qui servira à son tour de matrice pour allonger le second brin (voie de synthèse dépendante de l'hybridation de brin ou synthesis dependent strand annealing - SDSA). Des mutants de *S. cerevisiae* dans Sae2 (homologue de CtIP) ou de MRX (MRN chez l'homme) présentent une résection asymétrique après des cassures double brin induites par irradiation, suggérant que ces acteurs pourraient contrôler les interactions entre les extrémités envahissantes et non durant le SDSA (**Arora et al., 2017, Mol Cell Biol**). Majoritairement durant la méiose, la résolution par la voie de réparation des cassures double brin (double strand break repair - DSBR) est possible. Elle permet la capture de la seconde extrémité après synthèse pour constituer une double jonction de Holliday (dHJ) de part et d'autre de la boucle en D. Ces structures sont prises en charge par des endonucléases et résolvasés générant ou non des crossing over. Finalement, une réalisation de la RH indépendante de RAD51 est également possible ; celle-ci s'exerce par l'appariement des extrémités protubérantes simple-brin (single-strand annealing - SSA). Elle nécessite la présence de répétitions directes des deux côtés de la cassure. Aidées par l'activité de RAD52, les séquences d'ADN au-delà de la résection sont rapprochées et l'ADN débordant est excisé. Une perte d'information génétique est donc induite (**Heyer et al., 2010 Annu Rev Genet**).

I.3.2.3 Recombinaison homologue et réplication

Largement décrits dans la réparation des cassures double brin, les acteurs de la recombinaison homologue assurent également le maintien de la réplication, garantissant ainsi le transfert de l'information génétique des cellules mères aux cellules filles sans mutation ni réarrangement (Syeda *et al.*, 2014, *CSH perspectives*). L'altération de la dynamique de réplication d'une cellule est source d'instabilité génomique (Halazonetis *et al.*, 2008, *Science* ; Maya-Mendoza *et al.*, 2018, *Nature*). Cette duplication de l'ADN est un processus hautement contrôlé et organisé en trois étapes principales : (i) allumage d'une origine de réplication, (ii) synthèse de l'ADN par complémentarité de brin selon une élongation bidirectionnelle de part et d'autre de l'origine, (iii) terminaison lorsque deux fourches convergent et fusionnent (Burgers et Kunkel, 2018, *Annu Rev Biochem*). Agissant comme une « escorte » les facteurs de la recombinaison homologue sont en partie dédiés à la progression des fourches, à leur protection, leur redémarrage et à leur réparation durant la réplication (Carr *et al.*, 2013, *J Mol Biol* ; Patel and Weiss, 2019, *Biochem Soc Trans*).

- Protection

A la jonction d'une fourche arrêtée, une forme transitoire d'ADN simple brin nouvellement synthétisé est reconnue et recouverte par les protéines RPA et RAD51 (Zellweger *et al.*, 2015, *J Cell Biol*). La fourche peut alors se déplacer vers l'arrière, permettant la formation d'une jonction à trois voies contenant les brins naissants, recouverts de RAD51, limitant partiellement leur dégradation par les nucléases telles que MRE11, EXO1 ou DNA2 (Quinet *et al.*, 2018, *Mol Cell*) (Figure 5). La résolution totale de la structure pourrait se faire grâce à l'arrivée d'une fourche convergente active.

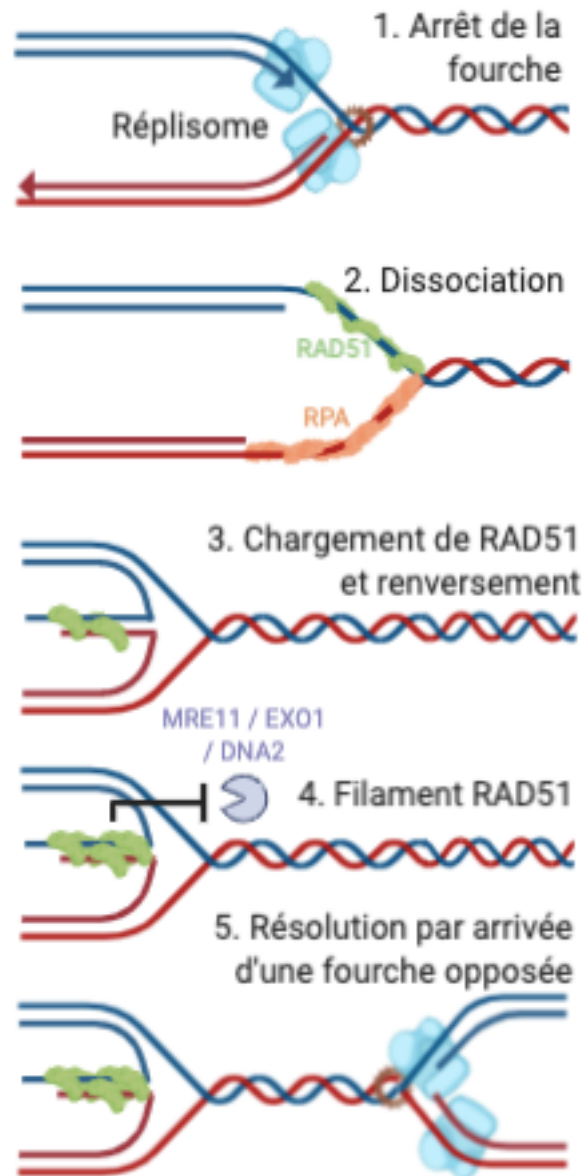


Figure 5 : Protection des fourches de réplication par les acteurs de la recombinaison homologue. Au niveau d'une fourche de réplication arrêtée le réplisome se dissocie, laissant des portions d'ADN simple brin libres qui seront recouvertes par RAD51 et RPA. Le recul de la fourche permet la formation d'une jonction à trois bras et le chargement de RAD51. La structure est résolue lors de l'arrivée d'une fourche de réplication convergente.

- Redémarrage

En présence d'une fourche de réplication non fonctionnelle, différentes hélicases et translocases peuvent induire le recul de la fourche de réplication, permettant la formation de la structure à trois bras décrite ci-dessus. Comme proposé chez *Schizosaccharomyces pombe*, la protéine Ku posséderait une fonction réplivative spécifique lui permettant de se fixer à

l'extrémité double brin de la forme révertée (**Teixeira-Silva *et al.*, 2017, Nature Communications**). Le complexe MRN faciliterait l'éviction de Ku et une première étape de résection permettrait la génération d'un ADN simple brin d'une centaine de paire de base, essentiel au recrutement des facteurs de la RH. Dans un second temps, une résection plus longue médiée par Exo1 peut avoir lieu mais cette seconde étape ne serait pas strictement indispensable au redémarrage de la fourche. Ku jouerait donc un rôle important pour assurer une résection de taille raisonnable, garantie de la stabilité génomique. L'ADN simple brin généré est recouvert de Rad51, capable d'envahir l'ADN parental afin de générer un intermédiaire en D-loop à partir duquel la synthèse d'ADN est ré-initiée (**Petermann *et al.*, 2010, Mol Cell**). Une solution alternative consiste en la résection du brin naissant retardé suivi par le recul de la fourche, générant un ADN nouvellement synthétisé simple brin disponible à sa reconnaissance par Rad51 qui pourra alors envahir le brin parental et ré-initier la réplication (Figure 6) (**Saada *et al.*, 2018, DNA Repair**).

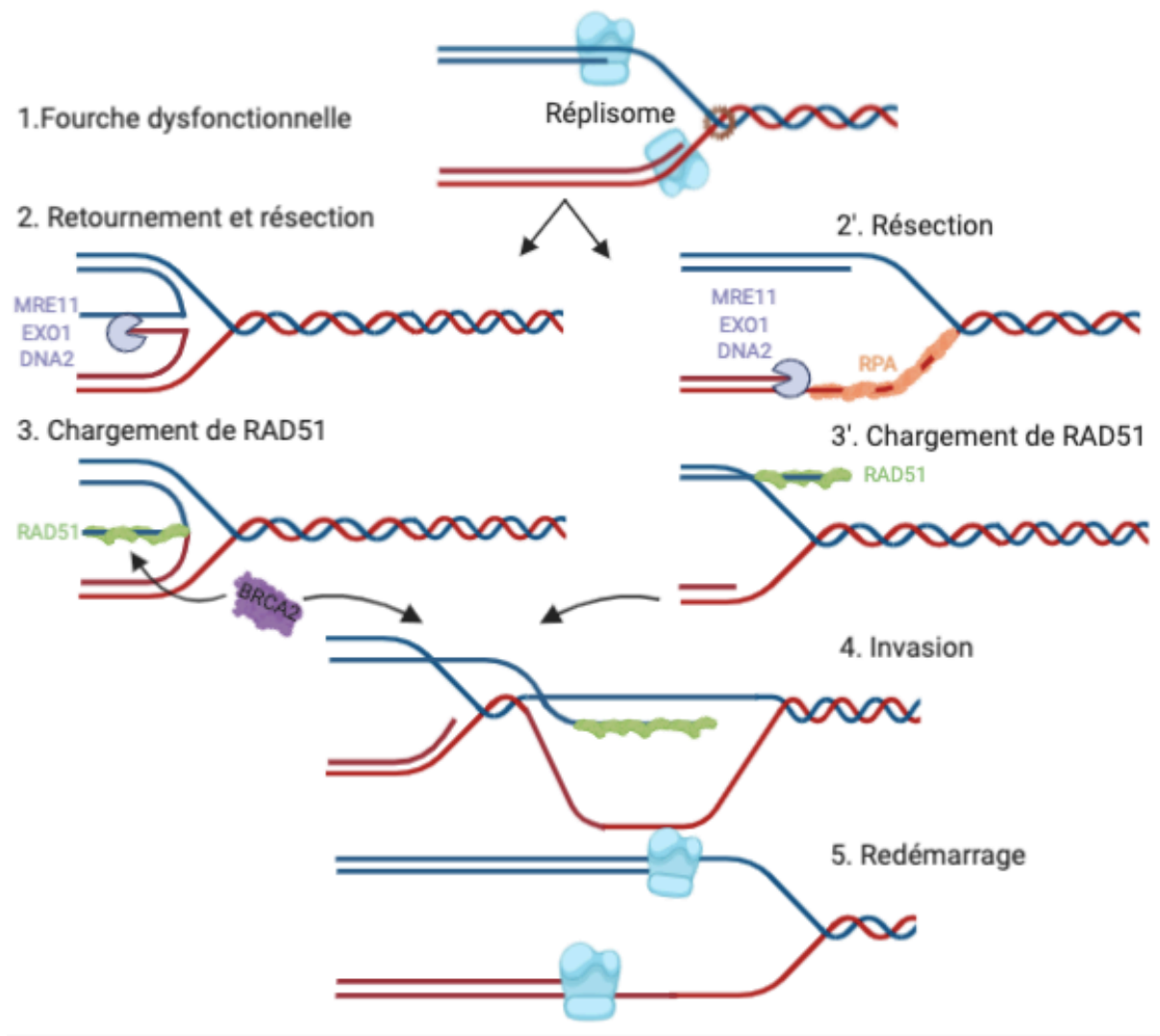


Figure 6 : Redémarrage d'une fourche de réplication dysfonctionnelle. En présence d'une fourche de réplication non fonctionnelle, la résection d'un brin naissant par Mre11, Exo1 et Dna2 permet l'exposition d'un ADN simple brin recouvert par Rad51 qui envahira le brin parental afin d'initier le redémarrage de la réplication.

- Réparation des lésions post réplcatives

Des études chez *Saccharomyces cerevisiae* montrent que lorsqu'une lésion de l'ADN est rencontrée par le complexe réplcatif, un désassemblage transitoire du complexe est possible, générant une cassure simple brin en amont de la jonction de la fourche. La fibre simple brin créée est recouverte par Rad51. La synthèse d'ADN est reprise par réamorçage en aval de la lésion, laissant un espace interne d'ADN simple brin derrière la fourche mobile. Le trou simple brin est agrandi par la machinerie de résection (Mre11, Exo1) facilitant le recrutement

de Rad51. La réparation est finalisée par recombinaison avec la chromatide sœur, en phase G2/M (**Gonzalez-Pietro *et al.*, 2013, EMBO**) (Figure 7).

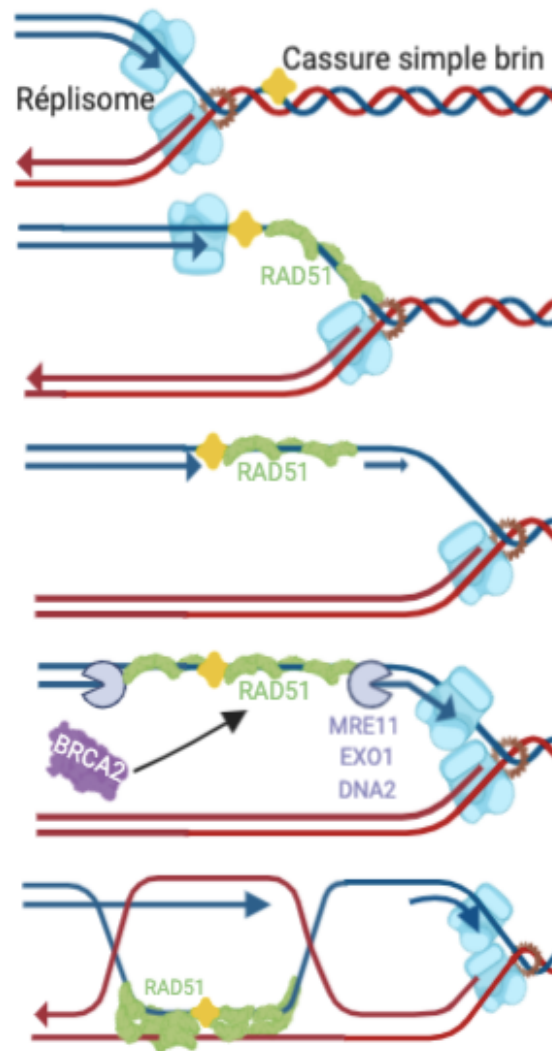


Figure 7 : Prise en charge des lésions post répliquatives. Le détachement provisoire du réplisome permet le chargement de RAD51, la reprise de la synthèse d'ADN est assurée en aval de la lésion. Les nucléases agrandissent le trou généré avant résolution de la structure par recombinaison avec la chromatide sœur.

Chez l'homme, la réparation des lésions post répliquatives peut également s'effectuer par un retournement de la fourche dépendant de HLTF (**Blastyak *et al.*, 2010, Mol Cell Biol**). Lorsque la lésion est située sur le brin avancé, la synthèse sur ce dernier peut se bloquer. Sur le brin opposé, la synthèse peut continuer bien au-delà du point de blocage. Sous l'action de HLTF, les brins naissants peuvent se retourner et s'hybrider les uns avec les autres créant une structure en jonction de Holliday à quatre voies. Les séquences complémentaires de la région endommagée sont synthétisées en utilisant le brin allongé comme matrice. La structure est ensuite inversée et la synthèse peut reprendre au-delà de la lésion.

Cependant, lorsque le complexe réplcatif arrive au niveau d'une cassure d'un des brins parentaux, le brin endommagé va être résecté. Pour ce faire, Ku et MRN reconnaissent simultanément l'extrémité double brin, le premier se fixant sur l'extrémité cassée de l'ADN, le second plus loin sur le brin endommagé. Ku recrute et active DNA-PK tandis que MRN recrute ATM, permettant de phosphoryler CtIP et activant ainsi l'activité endonucléase de MRE11. MRE11 coupe alors le brin endommagé, créant un gap qui sera étendu par EXO1 et DNA2 dans le sens 5'-3'. Le segment simple brin produit est reconnu par RPA. L'activité exonucléase 3'-5' de MRE11 contribue à la création d'un fragment 5' sur lequel est chargé Ku. Ce fragment sera clivé par CtIP. De la sorte, une extrémité 3' simple brin libre est créée, permettant le remplacement de RPA par RAD51 et initiant la RH (Figure 8) (Chanut *et al.*, 2016, *Nature Comm* et Deshpande *et al.*, 2020, *Science Advances*).

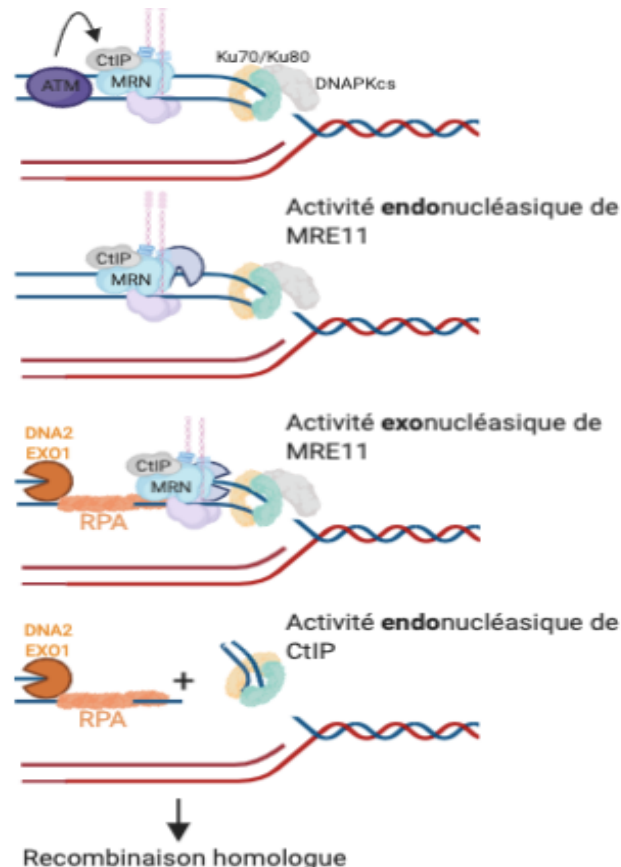


Figure 8 : Prise en charge des cassures simple brin sur un des brins parentaux durant la réplication chez l'homme. La cassure double brin est reconnue par le complexe Ku70/Ku80 associé à DNAPKcs. Le brin endommagé est résecté par le complexe MRN dans le sens 3'-5' vers la cassure puis par EXO1 et DNA2 dans le sens 5'-3'. La fibre simple brin est reconnue et recouverte par RPA. L'activité endonucléasique de CtIP chargée sur MRN permet la libération d'une extrémité 3' simple brin et l'initiation de la RH.

CHAPITRE II : Le complexe MRN

II.1 Description

II.1.1 Généralités

Composé des protéines MRE11 (Meiotic Recombination 11 homolog 1), RAD50 et NBS1 (Nijmegen breakage syndrome protein 1, également appelée Nibrin), le complexe MRN est un acteur central de la détection et de la réponse aux dommages de l'ADN (DNA Damage Response - DDR). Il intervient dans au moins quatre types de stress cellulaire : après une cassure double brin, au niveau des fourches de réplication arrêtées ou endommagées, auprès des télomères dysfonctionnels (cf partie II.2.4) et au cours d'une infection virale (cf partie II.2.3) (Oh et Symington, 2018, Genes) (Figure 9).

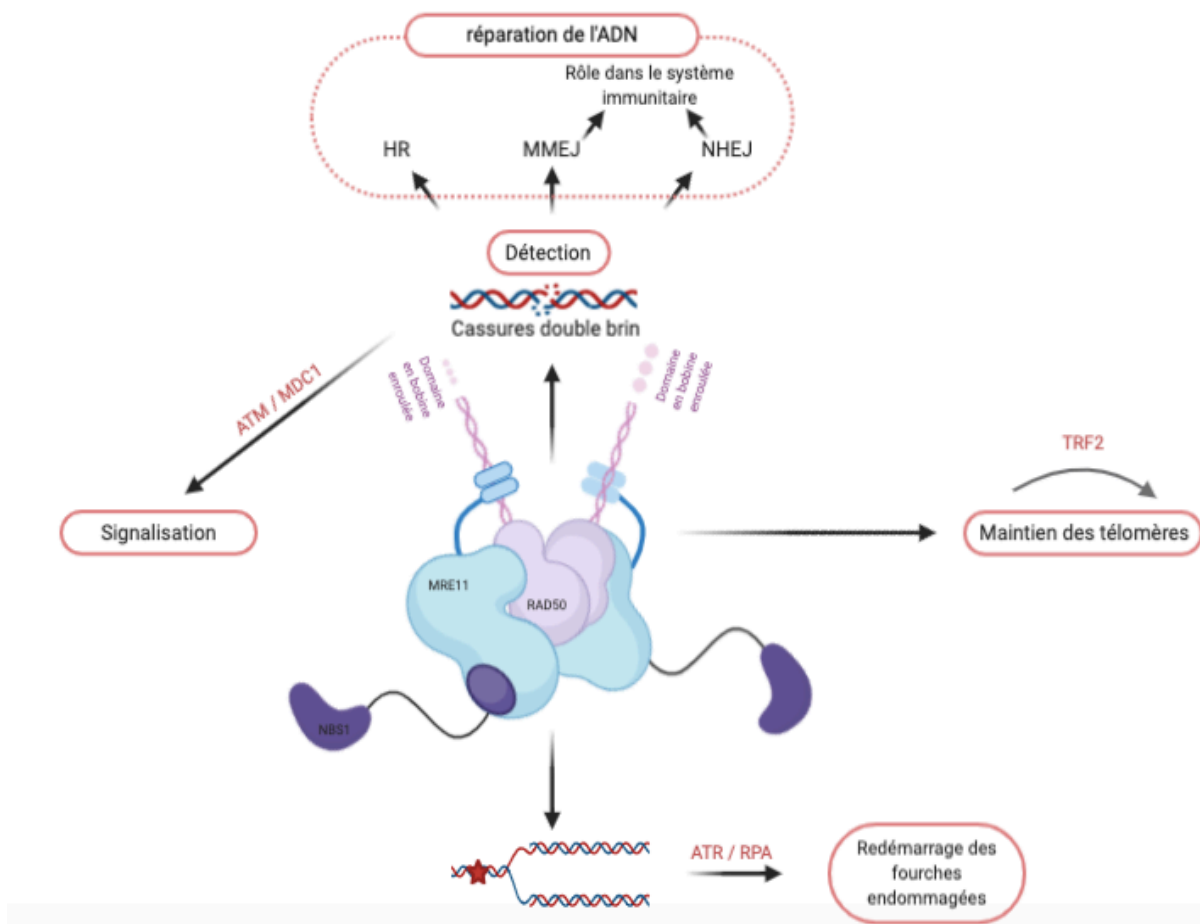


Figure 9 : Le complexe MRN et stress cellulaire. MRN agit comme un senseur et un effecteur de la réponse aux dommages de l'ADN, intervient dans la maintenance des télomères, dans la stabilité des fourches de réplication et également dans la réponse immunitaire.

Hautement conservé dans tous les domaines de la vie, le sous-complexe MRE11-RAD50 est présent chez les archae (par exemple *Pyrococcus furiosus*), les bactéries (SbcC/D chez *Escherichia Coli*) (**Sharples et al., 1995, Mol. Microbiol.**), certains phages (T4 phage) et les eucaryotes (*Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe* et l'homme). NBS1 (Xrs2 chez *S. cerevisiae*) n'est quant à lui présent que chez les eucaryotes.

Le complexe MRN est un hétérohexamère formé par l'association de deux dimères de chaque sous unités ($M_2R_2N_2$). La dimérisation de la protéine MRE11 permet l'assemblage des partenaires en complexe et parce qu'elle interagit avec NBS1, RAD50 et l'ADN, elle constitue le cœur du complexe (**Sung et al., 2014, EMBO**). De par sa taille et la présence de domaines flexibles non cristallisables, les structures complètes du complexe sont difficiles à élucider. Cependant, les caractéristiques structurales du complexe ou de ses composants ont été examinées par de nombreux moyens : cristallographie au rayons X, diffusion des rayons X aux petits angles (small-angle X-ray scattering – SAXS), ultracentrifugation analytique, spectrométrie de masse avec plasma à couplage inductif (ICPMS), diffusion dynamique de la lumière (DLS) ou encore microscopie de force atomique à grande vitesse (HS-AFM) et microscopie électronique (EM) (**Ando et al., 2014, Chem Review**). Toutes ces analyses ont permis d'établir que le complexe s'organise en :

- (i) Une tête globulaire capable de fixer l'ADN composée des deux protéines MRE11 et de deux domaines ABC ATPase de RAD50.
- (ii) Un domaine en bobine enroulée (coiled coil domain) prolongé par le domaine distal en crochet de zinc de RAD50 (**Moreno-Herrero et al., 2005, Nature ; Hopfner et al., 2002, Nature**).
- (iii) Un adaptateur flexible, formé par les protéines NBS1, qui fournit les interactions clés pour la signalisation cellulaire (Figure 10).

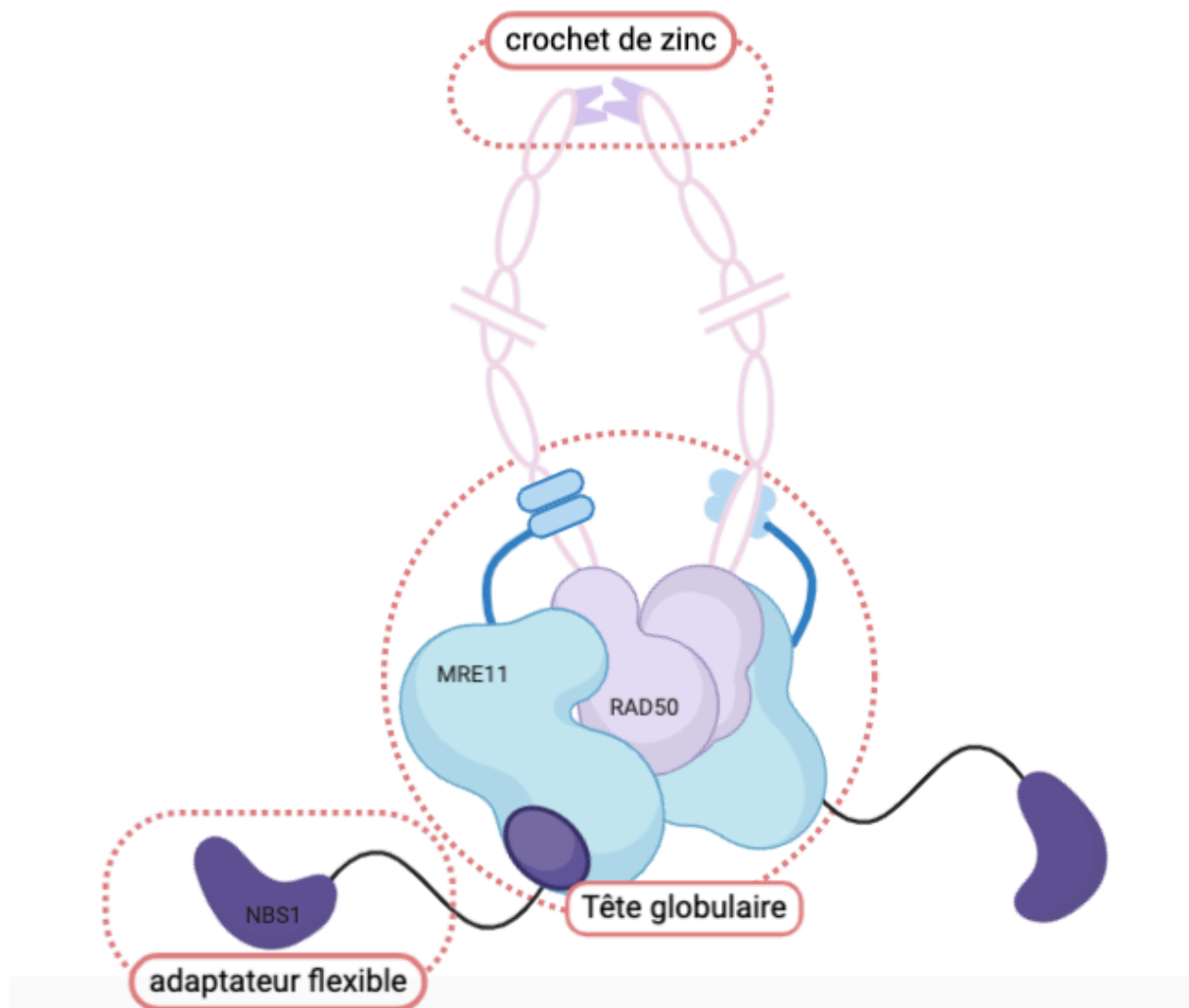


Figure 10 : Organisation du complexe MRN. Composé des protéines MRE11, RAD50 et NBS1, le complexe MRN s'organise en hétérohexamère avec autour d'une tête globulaire, le crochet de zinc de RAD50 et NBS1 comme adaptateur flexible.

Capable d'adopter de nombreuses conformations, le complexe MRN est principalement en charge de trois fonctions importantes de la DDR : (i) fixation/détection des lésions de l'ADN, (ii) création d'une synapse et rapprochement des ADN à lier à courte et moyenne distance (**Williams *et al.*, 2008, Cell**) et (iii) signalisation des dommages et activation des points de contrôle au travers de l'activation des protéines clé ATM (Ataxia-telangiectasia Mutated) et ATR (Ataxia-telangiectasia Rad3-related) (**Lee *et al.*, 2004, Science**). En activant la kinase ATM qui possède plus de 700 substrats et grâce à ses activités endonucléasiques et exonucléasiques, MRN participe à l'orchestration de la progression de la réponse aux dommages de l'ADN (**Matsuoka *et al.*, 2007, Science**).

Des études en molécule unique montrent que le complexe MRN est capable de diffuser le long de l'ADN, même en présence de nucléosomes afin de trouver les extrémités d'ADN

(Myler *et al.*, 2017, *Mol Cell* et Deshpande *et al.*, 2020, *Sci Adv*). *In vivo*, l'intégrité du complexe MRN est requise pour l'ensemble de ses fonctions indiquant l'interdépendance des partenaires pour leur stabilité.

Les structures et données fonctionnelles actuellement disponibles évoquent plusieurs modèles d'action possibles. Un des rôles du complexe MRN serait d'assurer la juxtaposition spatiale de molécules d'ADN en impliquant deux modes de fixation distincts. RAD50, via son crochet de zinc et son domaine en bobine enroulée faciliterait l'attachement à longue distance (en trans) entre deux molécules d'ADN comme une chromatide cassée et sa chromatide sœur intacte, tandis que MRE11 permettrait la formation d'une synapse à courte distance, rapprochant deux extrémités d'une cassure double brin d'ADN. Le complexe MRN pourrait également intervenir dans la réparation d'une cassure double brin en participant à sa reconnaissance et en détendant le chromosome homologue facilitant l'étape d'invasion dans la RH (Zabolotnaya *et al.*, 2020, *PNAS*). D'autres publications montrent chez la levure qu'au niveau d'une fourche de réplication arrêtée, le complexe MRX coopérerait avec des protéines pouvant remodeler la chromatine nouvellement synthétisée, des nucléases et des hélicases promouvant la résection de l'ADN naissant et le chargement des cohésines pour le maintien des chromatides sœurs (Delamarre *et al.*, 2020, *Mol Cell*).

II.1.2 MRE11

Hautement conservée, la protéine MRE11 est composée de 708 résidus chez l'homme et est organisée en deux domaines architecturaux principaux ; en partie C-terminale, deux domaines distincts de fixation à l'ADN et à son extrémité N-terminale un domaine phosphoestérase (Hopfner *et al.*, 2001, *Cell*) (Figure 11).

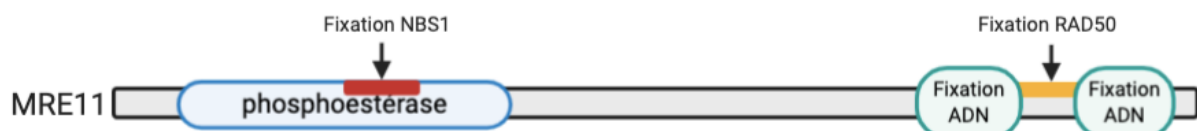


Figure 11 : La protéine MRE11. Interagissant avec les deux partenaires du complexe MRN et avec l'ADN, MRE11 constitue le cœur du complexe.

Dans la partie C-terminale de la protéine une région présentant un motif hélice-boucle-hélice est responsable de l'interaction de MRE11 avec la base du domaine en bobine enroulée de RAD50 (**Lammens *et al.*, 2011, Cell**). Riche en motif glycine-arginine, la zone C-terminale est sujette à des modifications post-traductionnelles (méthylation) indispensables à l'activité de la protéine (**Déry *et al.*, 2008, Mol Cell Biol**). L'extrémité N-terminale permet la dimérisation de MRE11 et la structuration d'un domaine catalytique en forme de L créant, en association avec deux ions métalliques Mn^{2+} , une rainure de liaison à l'ADN (**Hopfner *et al.*, 2001, Cell**). Ce domaine catalytique est composé de six boucles de reconnaissance dans lesquelles 17 résidus forment des contacts sucre-phosphate avec le sillon mineur de l'ADN. La fixation de MRE11 à l'ADN est donc indépendante de la séquence nucléotidique (**Williams *et al.*, 2008, Cell**). Le site actif de MRE11 est structuré pour s'accommoder avec de l'ADN à la fois simple ou double brin. Des expériences de SAXS (Small-angle X-ray scattering) ont permis de mettre en évidence deux conformations principales du dimère Mre11 procaryote (**Williams *et al.*, 2010, DNA repair**) suggérant qu'il est capable de distinguer une cassure double brin d'ADN d'une extrémité simple brin générée au niveau d'une fourche de réplication arrêtée ou endommagée (**Williams *et al.*, 2008, Cell**). Dans sa conformation symétrique, Mre11 se fixe aux deux extrémités d'une cassure double brin, formant une synapse de maintien des deux extrémités. Au contraire, lorsque Mre11 rencontre une extrémité simple brin au niveau d'une fourche de réplication endommagée, Mre11 adopte une conformation asymétrique (Figure 12).

Le passage d'une forme symétrique à asymétrique est permis par la rotation du monomère ne fixant pas l'ADN, bloquant l'accrochage d'une seconde extrémité d'ADN. Les différentes conformations pourraient donc représenter un signal critique permettant la régulation de l'activation des voies de signalisation. En effet, dans sa conformation symétrique Mre11 permet l'activation d'ATM nécessaire à la HR et dans sa forme asymétrique, ATR est activée pour le redémarrage des fourches de réplication endommagées (**Williams *et al.*, 2010, DNA repair**). Dans un second temps, ATM et ATR peuvent phosphoryler Mre11, facilitant la dissociation du complexe de la chromatine et agissant comme une boucle de rétroaction afin de limiter l'activité de MRN (**Di Virgilio *et al.*, 2009, DNA repair**).

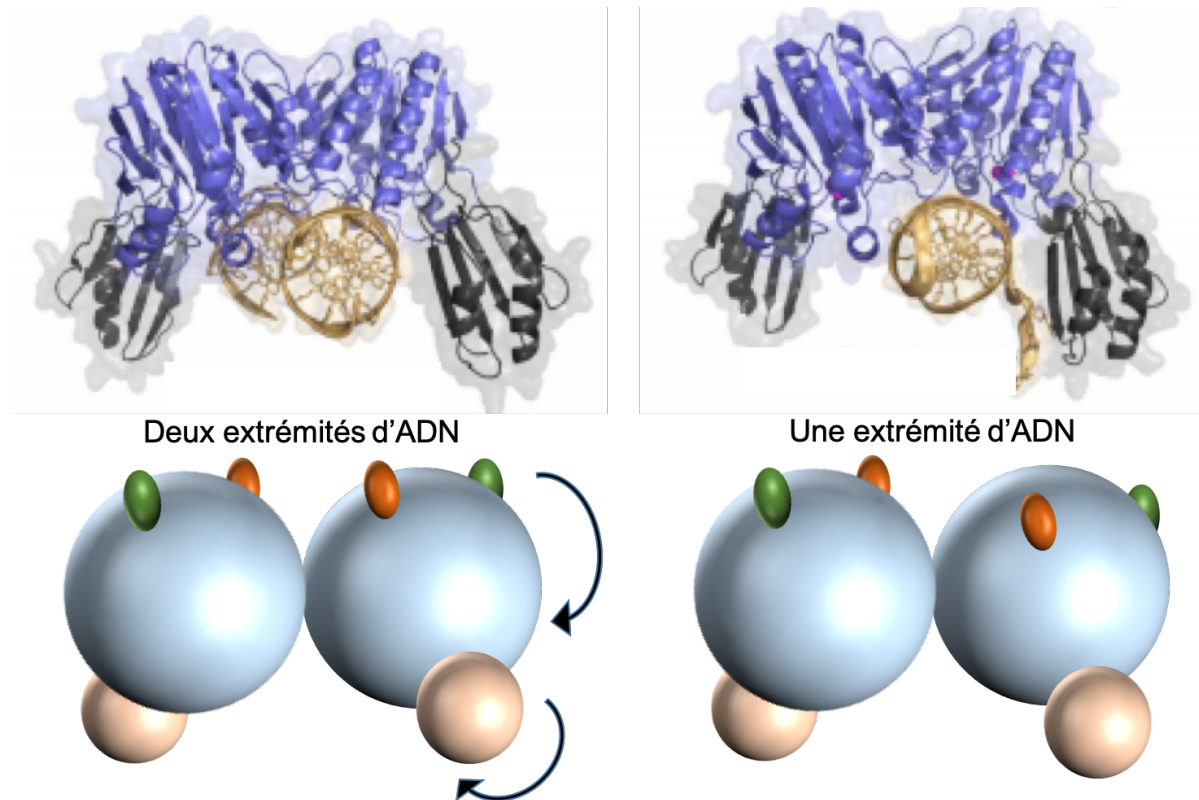


Figure 12 : Les différentes conformations de Mre11. Dans sa forme symétrique, Mre11 est capable de fixer deux extrémités d'ADN, comme à une cassure double brin par exemple. Dans sa conformation asymétrique, la protéine peut reconnaître une terminaison simple brin, au niveau d'une fourche de réplication arrêtée ou endommagée. Les marqueurs orange et vert servent de repères (adaptée de **Williams *et al.*, 2010, DNA Repair**).

Mre11 présente une activité endonucléasique et une activité exonucléasique 3'-5' permettant la résection de l'ADN et la création d'un ADN simple brin avec une extrémité 3' libre. L'hydrolyse de l'ATP par son partenaire Rad50 est un prérequis à certaines activités nucléasiques de Mre11 (**Trujillo and Sung, 2001, J Biol Chem**). Toutefois, *in vitro*, un ADN simple brin avec des structures secondaires peut être dégradé par le complexe Mre11/Rad50 en l'absence d'ATP (**Herdendorf *et al.*, 2011, J Biol Chem**) et Mre11 peut exposer une activité 3'-5' exonucléasique en l'absence de Rad50. Dans des conditions particulières (activité de protéines recombinantes *in vitro*) la présence de Nbs1 ou de Rad50 n'est donc pas essentielle à toutes les fonctions de Mre11. Toutefois, les activités nucléasiques de Mre11 sont renforcées lorsque les trois partenaires sont associés au sein du complexe MRN (**Paull et Gellert, 1999, Genes Dev**).

Chez l'homme, les mécanismes précis régissant la reconnaissance des extrémités de l'ADN par MRE11 et la manière dont les extrémités sont engagées dans son site actif restent flous. Il semble toutefois qu'après l'hydrolyse de l'ATP fixé à RAD50, MRE11, via un résidu histidine conservé de son site actif, induit une rotation des groupements phosphate de l'ADN sur environ 15 paires de base à l'extrémité du duplex d'ADN. Ce déroulement partiel de l'hélice d'ADN permet son ancrage dans le site actif de MRE11 promouvant son activité 3'-5' exonucléasique. Une mutation de cette histidine affecte l'activité exonucléasique mais pas son activité endonucléasique montrant que les deux activités ont un mécanisme différent (**Cannon et al., 2013, Proc Natl Acad Sci USA**).

Des inhibiteurs spécifiques de l'une ou l'autre des activités nucléasiques de MRE11 ont été développés. Les inhibiteurs de l'activité endonucléasique (PFM01 et PFM03) cachent le site de liaison à l'ADN simple brin tandis que l'activité exonucléasique peut être inhibée en bloquant l'histidine impliquée dans la rotation du squelette phosphate de l'ADN (mirine par exemple). Ces deux types d'inhibiteur réduisent l'activité de résection *in vivo* mais créent deux phénotypes distincts : l'inhibition de l'activité endonucléasique favorise la réparation des cassures double brin par NHEJ plutôt que par HR alors que l'inhibition de l'activité exonucléasique cause des défauts de réparation. Ces observations renforcent le modèle d'action de MRE11 dans la RH en deux étapes avec en premier lieu une activité endonucléasique empêchant le NHEJ puis, dans un second temps, une action exonucléasique promouvant la réparation par RH (**Shibata et al., 2014, Mol Cell**).

II.1.3 NBS1

La sous-unité NBS1 du complexe MRN est spécifique des eucaryotes (Xrs2 chez *S. cerevisiae*) (Figure 13).



Figure 13 : La protéine NBS1. Flexible, la protéine NBS1 permet l'interaction du complexe MRN avec de nombreux partenaires dont ATM.

Dans sa partie C-terminale, la protéine possède un domaine d'interaction avec MRE11 et un domaine d'interaction avec ATM qu'elle recrute aux dommages (**Schiller *et al.*, 2012, Nature Structural and Molecular Biology**). Le centre flexible de la protéine contient plusieurs motifs SQ qui représentent des sites de phosphorylation induites par les protéines ATM et ATR. En position N-terminale, NBS1 présente un domaine FHA (Forkhead-associated) et deux domaines BRCT (breast cancer-associated 1 C-terminus, BRCT1 et BRCT2). Le domaine FHA permet la fixation de résidus thréonine phosphorylés au sein d'un motif Ser-X-Thr présents dans de nombreuses protéines impliquées dans la réparation telles que MDC1 (Mediator of DNA Damage Checkpoint 1) et CtIP (**Lloyd *et al.*, 2009, Cell**). Les domaines BRCT1 et 2 permettent de fixer des protéines dont la sérine du motif Ser-X-Thr serait phosphorylée. Les domaines FHA et BRCT peuvent également favoriser conjointement le recrutement de protéines comme ATR.

L'organisation de la protéine NBS1 lui permet de traduire les signaux biologiques portés par les différentes conformations de MRE11. Lorsque MRE11 est dans une conformation symétrique, aux extrémités d'une cassure double brin, le site d'interaction de NBS1 avec ATM est disponible et ATM est recrutée et activée. Au contraire, lorsque MRE11 adopte une conformation asymétrique à la rencontre d'une fourche de réplication endommagée, le site d'interaction de NBS1 avec ATM est bloqué, la partie N-terminale de NBS1 est libre, permettant l'activation d'ATR (**Olson *et al.*, 2007, J Biol Chem**). De même, lorsque CtIP entre en interaction avec NBS1, la partie N-terminale de NBS1 change de conformation sur une longue distance, altérant l'interface entre BRCT1 et BRCT2. Ce mécanisme suggère un dialogue possible entre les domaines de fixation de NBS1 qui permettrait de moduler les interactions avec ses partenaires et guider le choix de la voie de réparation engagée (**Lafrance-Vanasse *et al.*, 2015, Progress in Biophysics and Molecular Biology**).

NBS1 ne possède pas d'activité enzymatique intrinsèque mais agit comme un adaptateur flexible en coordonnant les interactions du complexe MRN avec d'autres protéines (**Oh *et al.*, 2016, Mol Cell**), en influençant la fixation de l'ADN et en régulant les activités nucléasiques de MRE11. En effet, NBS1 potentialise les activités endo et exonucléasiques de MRE11 sur des extrémités d'ADN bloquées par l'ajout de protéines et stimule l'hydrolyse de l'ATP par RAD50. La nature de la protéine bloquant l'extrémité de l'ADN semble secondaire pour provoquer le clivage de l'ADN par le complexe MRN car, *in vitro*, la streptavidine fixée à une extrémité d'ADN peut induire l'activité endonucléasique de MRE11 (**Anand *et al.*, 2016,**

Molecular Cell). En outre, NBS1 est capable de limiter l'activité 3'-5' exonucléasique de MRE11 sur l'ADN ouvert (**Deshpande et al., 2016, Mol Cell**).

NBS1 présente un signal de localisation nucléaire (NLS) et est responsable de la translocation du complexe MRN dans le noyau. En effet, des expériences chez la levure montrent que des mutants de Nbs1 dépourvus du domaine d'interaction avec Mre11 sont normalement localisés dans le noyau alors que le complexe Mre11₂Rad50₂ reste cytoplasmique (**Desai-Mehta et al., 2001, Mol Cell Biol**). Chez la souris, cette région d'interaction avec mre11 est nécessaire et suffisante pour la viabilité cellulaire en l'absence du reste de la protéine nbs1 (**Kim et al., 2017, Cell Reports**).

II.1.4 RAD50

II.1.4.1 Généralités

Appartenant à la famille des protéines de maintenance de la structure des chromosomes (Structural Maintenance of Chromosome – SMC) comme les cohésines et les condensines par exemple, la protéine RAD50 constitue l'unité la plus grosse du complexe MRN (Figure 14).

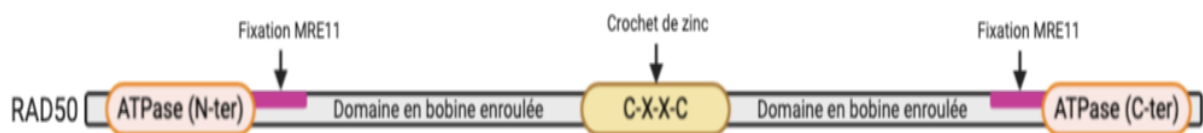


Figure 14 : La protéine RAD50. Repliée sur elle-même, la protéine RAD50 présente deux pôles distincts avec d'un côté un domaine ATPasique et de l'autre un domaine en crochet de zinc séparés par un long domaine en bobine enroulée.

Ses 1312 acides aminés chez l'homme sont organisés en :

- (i) Un domaine globulaire ATPasique. RAD50 possède un motif Walker A (motif de liaison aux groupes phosphate) en partie N-terminale et un motif Walker B (résidu glutamate intervenant de façon déterminante dans l'hydrolyse de l'ATP) en C-terminal. Associées l'une à l'autre, les extrémités N et C-terminales forment une cassette ATPasique (ATP-binding cassette –ABC) (**Hopfner et al., 2000, Cell**).

- (ii) Une longue tige flexible (**Van Noort *et al.*, 2003, PNAS**) conservée de 575 acides aminés organisés en motifs de sept résidus répétés ou heptades répétées (**Alani *et al.*, 1989, Genetics**), formant un domaine en bobine enroulée anti parallèle d'environ 150 Angströms (domaine coiled-coil).
- (iii) Un motif distal CXXC créant un crochet de zinc (**Cahill and Carney, 2007, Mutagenesis**).

II.1.4.2 Le crochet de zinc

Le crochet de zinc constitue la partie distale des extrémités de la protéine RAD50 repliée. Elle est composée d'un motif CXXC capable d'interagir, via un ion zinc, avec le crochet d'une seconde protéine RAD50. La protéine MRE11 est fixée à l'intersection du domaine globulaire et du domaine en bobine enroulée de RAD50, sur environ 6 heptades (**Williams *et al.*, 2011, Nat Struct Mol Biol**). L'association de deux protomères MRE11-RAD50 permet la formation d'un complexe MRE11₂RAD50₂ (M₂R₂) au moyen du crochet de RAD50. Cette homodimérisation est donc dépendante d'un ion zinc.

Chez la levure, l'ablation totale du crochet de zinc phénocopie un déficit complet du complexe MRX(N) (**Wiltzius *et al.*, 2005, Nat Struct Mol Biol**) sous entendant que le crochet de Rad50 est requis pour la stabilité et l'activité du complexe MRX(N). De plus, des mutations dans ce domaine entraînent une augmentation de la fragmentation chromosomique suggérant que le domaine est essentiel pour la cohésion des extrémités chromosomiques. Des mutations dans les cystéines conservées du crochet de zinc ont un effet global sur la stabilité du complexe MRX(N), impactent l'interaction de Rad50 avec Mre11, entraînent une augmentation de la sensibilité aux agents génotoxiques induisant des cassures double brin en limitant l'activation d'ATM (**He *et al.*, 2012, J Biol Chem**) et perturbent la maintenance des télomères. Chez l'homme, la mutation d'un résidu cystéine abroge la dimérisation des complexes MRN via le crochet. Toutefois, cette absence de dimérisation ne semble pas affecter l'interaction de RAD50 avec MRE11 ni perturber la fixation à l'ADN du complexe MRN (**Cahill and Carney, 2007, Mutagenesis**). Ces observations ont été confirmées chez la souris (**Roset *et al.*, 2014, Genes & Development**). Le crochet de zinc de RAD50 peut être remplacé par la charnière portée par d'autres protéines de la famille des SMC (telle que celle de la condensine bactérienne MukB). La protéine chimérique ainsi créée conserve son activité de réparation montrant que le crochet de zinc agit comme une interface de dimérisation stable (**Tatebe *et al.*, 2020, Nat Commun**).

Le domaine en crochet influence donc l'activité au niveau du domaine globulaire grâce au domaine en bobine enroulée qui communique des perturbations structurales. Les influences peuvent intervenir dans les deux sens et le domaine en bobine enroulée de Rad50 devient moins flexible lors de la fixation du complexe à l'ADN. Le domaine en bobine enroulée n'est donc pas qu'une tige ou un écarteur entre le domaine globulaire et le crochet de Rad50, mais plus un lien mécanique structurel critique.

II.1.4.3 Le domaine en bobine enroulée (coiled coil domain)

La séquence protéique du domaine en bobine enroulée est organisée en motifs de sept résidus répétés ou heptades contenant des acides aminés hydrophobes en position 1 et 4 et une forte proportion de résidus électriquement chargés aux autres positions. Ces heptades répétées forment des structures en hélice alpha capables de s'enrouler les unes sur les autres créant ainsi une superhélice ou coiled coil (**Alani *et al.*, 1989, Genetics**). Le domaine en bobine enroulée de RAD50 est composé de cinq hélices. Les deux premières (H1 et H2) sont séparées des trois suivantes (H3, H4 et H5) par le domaine en crochet de zinc (Figure 15) créant une structure antiparallèle. Juste en dessous du crochet de zinc, des interactions entre deux domaines en bobine enroulée sont possibles. Les hélices H2-H2' et H4-H4' de deux protéines RAD50 d'un complexe MRN forment des interactions hydrophobes qui stabilisent cette zone de contact et agissent ainsi en connivence avec la fonction de dimérisation intramoléculaire du crochet de zinc. Les hélices H1 et H5 forment la partie basale du domaine séparée de la partie apicale par une charnière flexible. Cette charnière permet les changements conformationnels induits par la fixation et l'hydrolyse d'ATP (**Park *et al.*, 2017, Nature Struct Mol Biol**).

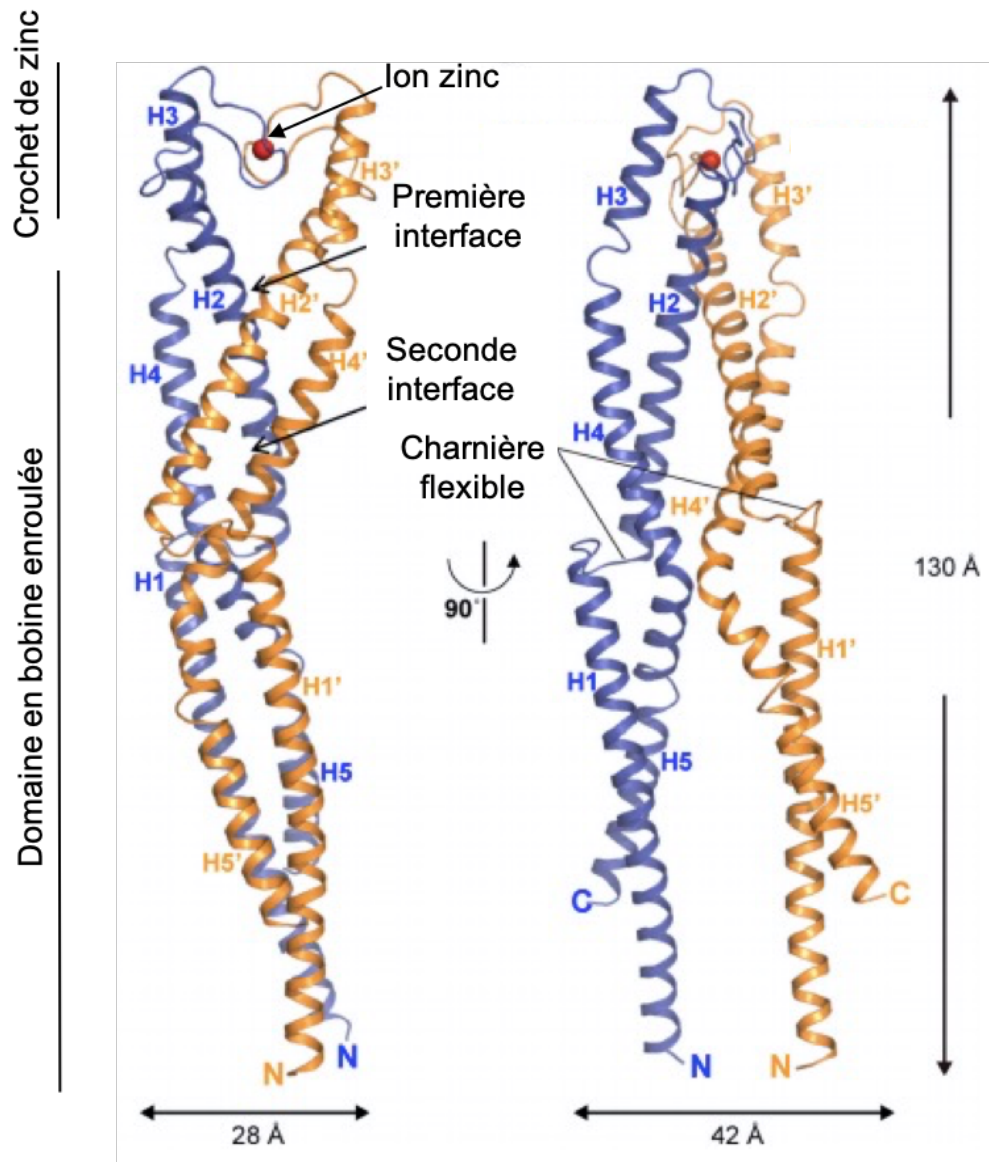


Figure 15 : Organisation du domaine en bobine enroulée de RAD50. Chez l'homme, les hélices s'organisent en une structure anti parallèle (adaptée de **Park *et al.*, 2017, Nature Struct Mol Biol**).

Bien qu'il ait été démontré que le domaine en bobine enroulée de Rad50 soit primordial pour l'activité du complexe MRN(X) chez la levure, son rôle précis n'est pas encore clairement établi, en particulier chez l'homme. Un raccourcissement important du domaine en bobine enroulée entraîne une perte de flexibilité de la structure et l'abolition de la recombinaison homologe chez la levure. Des délétions de taille plus modérée peuvent être tolérées, à condition que le crochet de zinc soit intact. Dans ce cas, la RH est restaurée et le NHEJ est affecté mais de manière moins dépendante de la présence du crochet (**Hohl *et al.*, 2012, Nat Struct Mol Biol**).

II.1.5 Modèles

II.1.5.1 Dimérisation intra ou inter moléculaire

Plusieurs modèles existent pour décrire l'association des partenaires au sein du complexe. Le premier propose une dimérisation qui s'effectuerait de manière intra ou intermoléculaire (Figure 16). Soit :

- au sein d'un multi complexe $M_2R_2N_2$ les deux crochets des deux protéines RAD50 interagiraient, formant une structure en forme d'anneau permettant l'interaction des domaines ATPasiques. Cette homodimérisation intramoléculaire entraînerait le rapprochement de deux extrémités d'ADN à relier (**Moreno-Herrero *et al.*, 2005, Nature**). Chez les eucaryotes, ce mode de dimérisation serait prédominant.
- deux crochets de deux complexes MRN distincts interagiraient entre eux permettant une homodimérisation intermoléculaire. Dans cette structure, deux protomères s'orienteraient l'un par rapport à l'autre avec un angle d'environ 140° . Les domaines globulaires se retrouveraient aux extrémités distales de l'assemblage et pourraient interagir avec deux autres protomères pour former deux complexes MRN distincts mais liés (**Hopfner *et al.*, 2002, Curr Opin Struct Biol**).

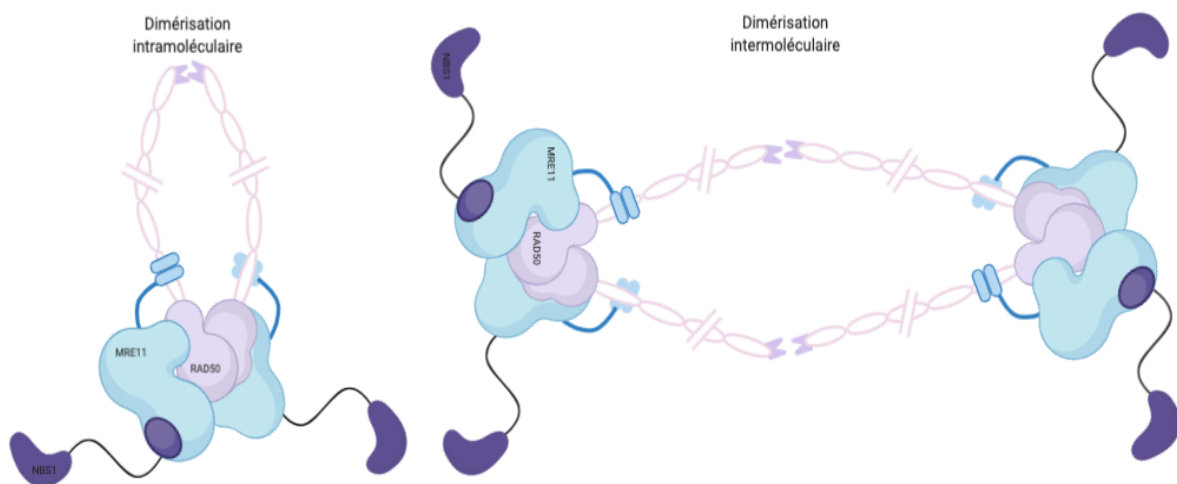


Figure 16 : Homodimérisation de RAD50. La dimérisation de Rad50 pourrait s'effectuer de manière intra ou intermoléculaire, permettant de relier deux complexes MRN entre eux. Des analyses par microscopie à force atomique (AFM) remettent en question la capacité de dimérisation intermoléculaire du complexe MRN. La conformation principale du complexe

M_2R_2 humain et de la levure serait ouverte, en forme de V, liant les domaines globulaires mais sans interaction des crochets de zinc de RAD50. En solution, le complexe MRE11/RAD50 humain montrerait la capacité de s'ouvrir et de se fermer via le crochet de zinc de manière transitoire (**Moreno-Herrero *et al.*, 2005, Nature**). De manière surprenante, une telle conformation ouverte ne serait pas observée pour les complexes bactériens et des archées (**Van Noort *et al.*, 2003, Proc Natl Acad Sci**) alors que le crochet de zinc de Rad50 est très conservé au cours de l'évolution.

En 2020, des expériences de microscopie de force atomique à haute vitesse (HS-AFM), en présence ou en absence d'ATP, ont permis d'observer principalement deux configurations du complexe M_2R_2 : régulièrement avec la tête globulaire fermée et les crochets de zinc liés (modèle de dimérisation intramoléculaire en anneau), occasionnellement avec la tête globulaire ouverte et les crochets de zinc liés (Figure 17). De plus, cette étude décrit un mode de multimérisation qui s'effectuerait plutôt via le domaine globulaire du complexe MRN (**Tatebe *et al.*, 2020, Nature Comm**).

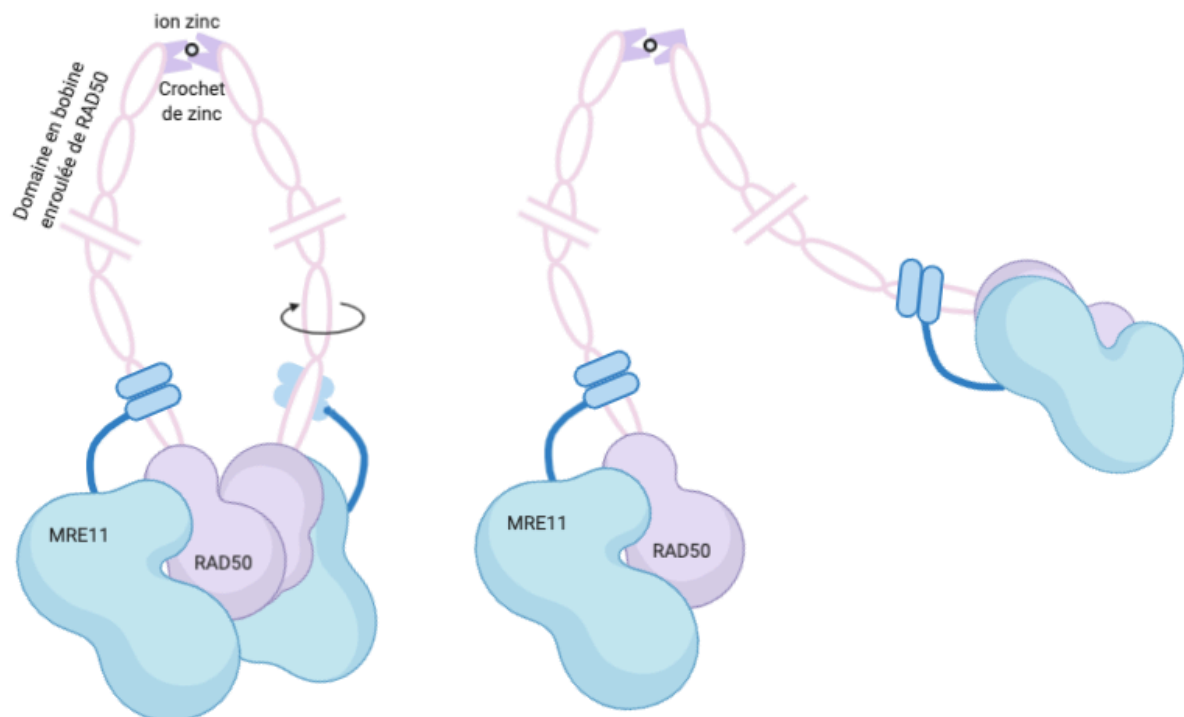


Figure 17 : Les possibles conformations du complexe MRN après analyse par HS-AFM. Le crochet de zinc toujours fermé permettrait l'ouverture du complexe au niveau de la tête globulaire.

Toutefois, ces expériences *in vitro* réalisées sur des complexes protéiques MRE11₂/RAD50₂ humains purifiés, sans NBS1 ni ADN, pourraient ne refléter que partiellement les modes d'activité du complexe *in vivo*, c'est-à-dire dans un contexte physiologique.

II.1.5.1 Hydrolyse de l'ATP et changements conformationnels

Les mécanismes structuraux expliquant comment le complexe MRN détecte et traite des extrémités propres et bloquées d'ADN ne sont pas encore parfaitement élucidés. L'adoption des différentes conformations possibles de Rad50 serait dictée par la fixation et l'hydrolyse de deux molécules d'ATP. L'hydrolyse de l'ATP par Rad50 chez *P. furiosus* n'est pas assez efficace pour supporter une activité motrice ou hélicase (**Hopfner et al., 2001, Cell**) mais elle permettrait plutôt une fonction de commutateur de conformations. Chez *S. cerevisiae* des mutations qui perturbent l'activité ATPasique de Rad50 sensibilisent les cellules aux agents causant des cassures double brin (**Chen et al., 2005, J Biol Chem**).

Après hydrolyse de l'ATP, les sous unités ATPasiques de Rad50 procaryote seraient flexibles et relativement ouvertes, les bras relaxés. L'ouverture partielle des sous unités catalytiques de Rad50 serait possible, libérant le site de fixation à l'ADN et les sites actifs de Mre11 pour initier ses activités endonucléasique et exonucléasique (**Rojowska et al., 2014, EMBO**). Il existerait un intermédiaire conformationnel ayant hydrolysé l'ATP mais fixant toujours l'ADP et un ion phosphate (PO_4^{3-}) (**Reindl et al., 2013, Mol Cell**). Cet intermédiaire permettrait l'activité endonucléasique de Mre11 à distance de la cassure, limiterait son activité exonucléasique et faciliterait l'accès du complexe à l'ADN double brin. Après hydrolyse complète de l'ATP, le domaine ATPasique de Rad50 s'ouvrirait totalement, l'ADN double brin deviendrait accessible et Mre11 pourrait commencer son activité 3'-5' exonucléasique en direction de la coupure avant de s'en détacher (**Syed et Tainer, 2018, Annual Review of Biochemistry**).

Au contraire, la fixation des ATPs entraînerait de grands changements conformationnels, durant lesquels au sein d'un monomère, l'extrémité N-terminale tournerait d'environ 35° autour de l'extrémité C-terminale (**Hopfner et al., 2000, Cell**). Ce mouvement permettrait aux motifs Walker A et B d'entrer en interaction « en tête à queue » pour former le site actif ABC-ATPase prenant en sandwich deux molécules d'ATP à l'interface du dimère (**Williams et al., 2011, Nat Struct Mol Biol ; Möckel et al., 2012, Nucleic Acids Research**). Cette conformation fermée plus rigide entraînerait l'activation d'ATM, la fermeture des domaines catalytiques de Mre11 (**Lim et al., 2011, Genes Dev**) et formerait une rainure centrale

capable de se fixer à l'ADN double brin sur environ 18 paires de base (Seifert *et al.*, 2016, EMBO). Des images du complexe en présence d'ADN suggèrent que cette conformation faciliterait la dimérisation intermoléculaire du complexe via le crochet de zinc et la recherche des lésions de l'ADN en permettant la diffusion du complexe le long de la chromatine.

Ces études cristallographiques montrent donc que la fixation de l'ATP entraînerait la fermeture du complexe fermement autour de l'ADN. De manière surprenante, cet état bloquerait l'activité de Mre11 alors que l'ATP est critique pour le traitement de l'ADN par MRN. Par cryo-microscopie électronique, il a récemment été montré que la protéine Rad50 bactérienne formerait en fait le principal élément de fixation à l'ADN via ses domaines globulaire et en bobine enroulée. La détection d'une cassure double brin induirait l'hydrolyse de l'ATP, un changement de conformation global et le mouvement du domaine en bobine enroulée vers l'intérieur du complexe qui zipperait et prendrait une forme de tige. Dans cette forme, le domaine en bobine enroulée fixerait fortement le duplex d'ADN double brin tandis que Mre11 se repositionnerait vers la tête globulaire de Rad50. Ainsi, l'espace libéré entre le domaine en bobine enroulé et le domaine globulaire formerait un site actif en forme de tunnel capable d'accueillir les extrémités d'ADN. Dans ce tunnel, uniquement un monomère Mre11 serait en contact avec l'ADN tandis que l'autre monomère Mre11 aiderait à positionner la sous unité catalytique de Rad50 (Figure 18). En l'absence d'ADN, le complexe MR adopterait une conformation de repos dans laquelle la fonction nucléase serait auto-inhibée (Käshammer *et al.*, 2019, Mol Cell).

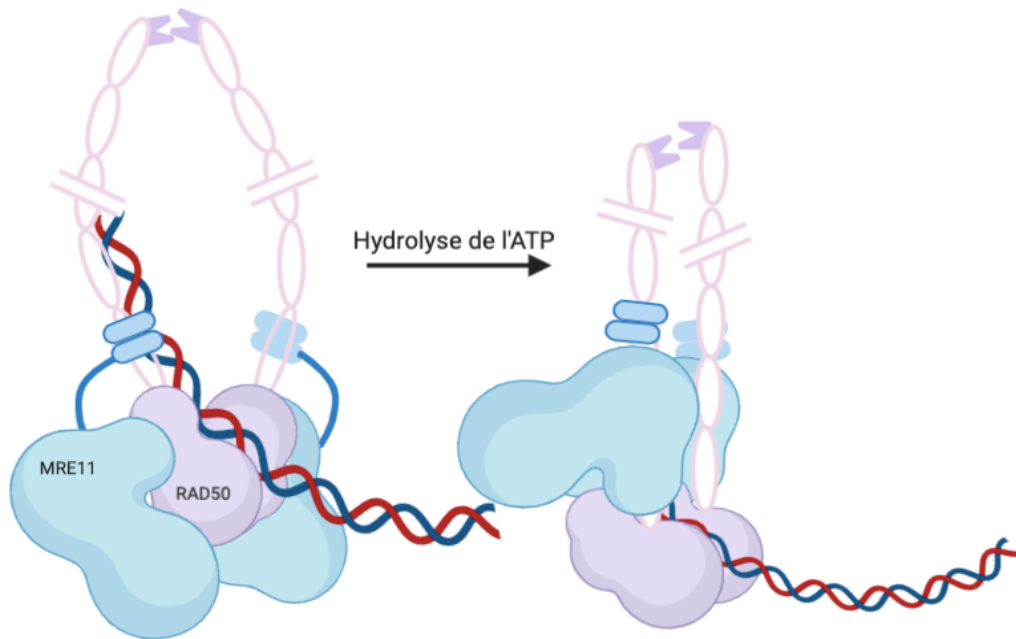


Figure 18 : Changements conformationnels et hydrolyse de l'ATP en présence d'ADN. Dans sa conformation en anneau, le complexe MRN pourrait diffuser le long de l'ADN. A la rencontre d'une extrémité d'ADN double brin, le domaine en bobine enroulée de Rad50, après hydrolyse de l'ATP, prendrait une forme de tige rigide, créant une zone de haute affinité avec l'ADN.

L'hydrolyse de l'ATP par Rad50 est un processus assez lent (**Majka *et al.*, 2012, J Biol Chem**) et constitue une étape limitante. La forme de Rad50 ayant fixée de l'ATP existe donc pour une durée de temps considérable (**Herdendorf et Nelson, 2014, Biochemistry**). Chez la levure, une mutation qui renforce la conformation fermée de Rad50 avec des ATP fixés entraîne une réduction de l'activité ATPasique et facilite l'accrochage du complexe aux extrémités d'ADN. Ce mutant est plus compétent pour le NHEJ que la souche sauvage. Au contraire, une mutation qui réduit la capacité de fixation de l'ATP de Rad50 entraîne une hydrolyse plus rapide. La protéine Rad50 mutée est plus longtemps dans une conformation ouverte que la protéine sauvage, augmentant l'activité nucléasique de Mre11 et favorisant la voie de réparation par RH. Les deux mutants présentent un défaut de réparation des cassures double brin et d'activation d'ATM. Ces expériences montrent que la cinétique du complexe MRN dans l'une ou l'autre des conformations est critique pour ses fonctions. Moduler l'activité ATPasique de RAD50 pourrait donc affecter la biologie de la cellule en orientant le choix d'une voie de réparation ou en influençant la signalisation cellulaire (**Deshpande *et al.*, 2014, EMBO**).

La combinaison des différentes structures possibles de Mre11 avec les changements conformationnels de Rad50 induits par la fixation et l'hydrolyse de l'ATP ainsi que la possibilité d'interactions et de communication via Xrs2 (NBS1) et le crochet de zinc de Rad50, permettent au complexe MRX(N) d'adopter de très nombreuses conformations distinctes. Au vue de la conservation du complexe à travers les espèces, ces observations peuvent probablement être transposées chez l'homme. Les caractéristiques dynamiques font de MRN une machine protéique capable de participer à de nombreuses voies de réparation (NHEJ, a-NHEJ ou encore HR), à la stabilité des fourches de réplication et à la maintenance des télomères.

II.2 Activités biologiques

II.2.1 *MRN et réparation*

II.2.1.1 Détection

En l'absence de dommage à l'ADN, le complexe MRN est présent de manière diffuse dans le noyau et sa concentration reste constante durant toute la durée du cycle cellulaire (**Maser *et al.*, 1997, Mol Cell Biol**). Le complexe MRN joue un rôle précoce dans la réponse aux dommages de l'ADN car il agit comme un senseur de cassures double brin, c'est-à-dire qu'il détecte les dommages à l'ADN et active des protéines kinases qui initieront à leur tour une cascade de signaux de transduction formant la réponse aux dommages de l'ADN (**Petrini and Stracker, 2003, Trends Cell Biol**).

Des images de microscopie en molécule unique à haut débit montrent que le complexe MRN humain serait capable de diffuser le long de l'hélice d'ADN, y compris en présence de nucléosomes, pour y trouver des extrémités libres (**De Jager *et al.*, 2001, Mol Cell ; Myler *et al.*, 2017, Mol Cell**). RAD50 faciliterait la diffusion alors que MRE11 assurerait le contact direct avec les extrémités d'ADN. Néanmoins, le complexe MRN est aussi capable de reconnaître de nombreuses extrémités d'ADN bloquées différentes suggérant que le complexe pourrait plutôt se fixer initialement sur un site interne, sans forcément s'engager avec les extrémités d'ADN. Une fois reconnu, MRN colonise rapidement l'ADN coupé comme le suggèrent des analyses d'immunofluorescence *in vivo* montrant le recrutement précoce de NBS1 au site de cassure double brin induite par micro-irradiation laser (**Lukas *et al.*, 2003, NCB**).

II.2.1.2 Signalisation

Une fois à la cassure double brin, MRN recrute et active ATM au moins en partie via l'interaction directe avec la partie C-terminale de NBS1. Cette région C-terminale ne semble pour autant pas absolument indispensable au recrutement d'ATM puisque sa perte est compensée par d'autres médiateurs tels que 53BP1 (**Lee *et al.*, 2010, EMBO**). Toutefois, l'interaction MRN-ATM permet l'augmentation de la concentration d'ATM aux abords de la cassure et induit l'autophosphorylation des dimères d'ATM. Cette autophosphorylation permet la dissociation des dimères en monomères garantissant une activité kinase optimale.

L'activation d'ATM induit la phosphorylation de nombreuses cibles dont l'histone H2AX dans les environs de la cassure (γ H2AX). La détection de γ H2AX par immunofluorescence peut se faire rapidement mais le complexe MRN est recruté encore plus précocement au point de cassure car le recrutement de MRN n'est pas affecté par l'absence de H2AX (**Celeste *et al.*, 2002, Science**). NBS1 se fixe à H2AX après sa phosphorylation, aboutissant à une seconde vague de recrutement/activation de MRN au site de coupure. Le recrutement de MRN au point de cassure est également indépendant de MDC1 (Mediator of DNA-damage checkpoint 1), protéine recrutée après la modification de la chromatine, colocalisant avec γ H2AX (**Stucki *et al.*, 2005, Cell**) et à l'origine des recrutements ultérieurs de 53BP1 et BRCA1. Néanmoins, MDC1 est capable d'interagir avec le complexe MRN via NBS1 (**Goldberg *et al.*, 2003, Nature**). L'utilisation de siRNA dirigés contre MDC1 ou une mutation dans NBS1 sur son domaine de fixation avec MDC1 empêche l'engagement soutenu de MRN avec l'ADN cassé. MDC1 agirait donc plutôt comme une plateforme d'interaction dépendante de H2AX, permettant la transition entre un simple recrutement du complexe MRN au site de cassure et la création d'interactions fortes entre MRN et l'ADN (**Lukas *et al.*, 2004, EMBO**). En outre, comme démontré chez l'homme, la protéine Rad17 (protéine de contrôle du cycle cellulaire, replication factor C like DNA damage sensor) faciliterait également le recrutement de MRN via une autre interaction avec NBS1. Rad17 serait ensuite phosphorylé par ATM, lui-même activé par MRN, créant ainsi une boucle d'amplification ATM-Rad17-MRN-ATM et une activation efficace du signal MRN/ATM (**Wang *et al.*, 2014, EMBO**). Finalement, le complexe MRN est recruté au site de coupure de manière très précoce mais ce recrutement est amplifié par des interactions avec d'autres facteurs, tels que MDC1 ou Rad17.

En plus d'activer ATM, le complexe MRN peut induire l'activation de la kinase ATR au niveau d'une fourche de réplication arrêtée ou endommagée. Les recrutements d'ATM et

ATR permettent la régulation du cycle cellulaire (via les kinases CHK2 et CHK1 respectivement), le remodelage de la chromatine nécessaire à la réparation et le recrutement et la rétention des facteurs de réparation au site de cassure.

II.2.1.3 Actions et régulation

Le complexe MRN doit s'éloigner de 100 à 200 paires de base du site de cassure reconnu pour initier une coupure simple brin grâce à l'activité endonucléasique de Mre11. L'initiation de cette activité endonucléasique requiert la phosphorylation de CtIP par des CDKs (cyclin-dependent kinases). La régulation par les CDKs permet d'assurer que la résection n'aura lieu qu'en phase S/G2 lorsqu'une chromatide sœur est disponible (**Huertas *et al.*, 2008, Nature**). Chez la levure, CtIP phosphorylé sur sa partie C-terminale est capable d'interagir directement avec Rad50 (**Cannavo *et al.*, 2018, Nat Comm**) et activerait l'hydrolyse de l'ATP. Puisque l'hydrolyse de l'ATP semble nécessaire à l'activité nucléasique de Mre11, CtIP phosphorylé pourrait ainsi contrôler l'activité endonucléasique de Mre11 (**Cannavo et Cejka, 2014, Nature**). CtIP faciliterait donc la transition depuis l'activité de senseur des cassures de MRN à celle de processeur des extrémités (**You *et al.*, 2009, Mol Cell**). Chez l'homme, l'inhibition de MRE11 et/ou de CtIP diminue la fréquence de réparation par HR (**Sartori, 2007, Nature**).

In vitro, l'activité endonucléasique du complexe bactérien est fortement favorisée par la présence de protéines bloquant les extrémités d'ADN (streptavidine ou avidine) (**Connelly *et al.*, 2003, DNA Repair**). *In vivo* chez *S. cerevisiae*, le complexe MRN reconnaît également le facteur Ku lorsqu'il est fixé aux extrémités d'ADN (**Wang *et al.*, 2017, Genes Dev**) et peut enlever les topoisomérases covalamment liées à l'ADN. La coupure faite par Mre11 crée un point d'entrée à la machinerie des hélicases et nucléases (Blm en complexe avec Exo1 et/ou Dna2) qui effectuent une longue résection dans le sens 5'-3'. Mre11 prend en charge la dégradation dans le sens 3'-5' grâce à son activité exonucléasique (Figure 19). Les actions combinées des nucléases et hélicases entraînent la création d'un ADN simple brin de plus de 1000 bases nécessaire à l'invasion du brin homologue pour réparation par recombinaison homologue. La partie simple brin d'ADN créée est rapidement recouverte par les protéines Rpa puis Rad51, formant un nucléofilament, réduisant alors la capacité d'attachement de Exo1 sur l'ADN. Dans ces conditions, l'attachement physique entre Exo1 et le complexe MRN permet de maintenir l'efficacité de Exo1 en favorisant son interaction avec l'ADN (**Myler *et al.*, 2017, Mol Cell**).

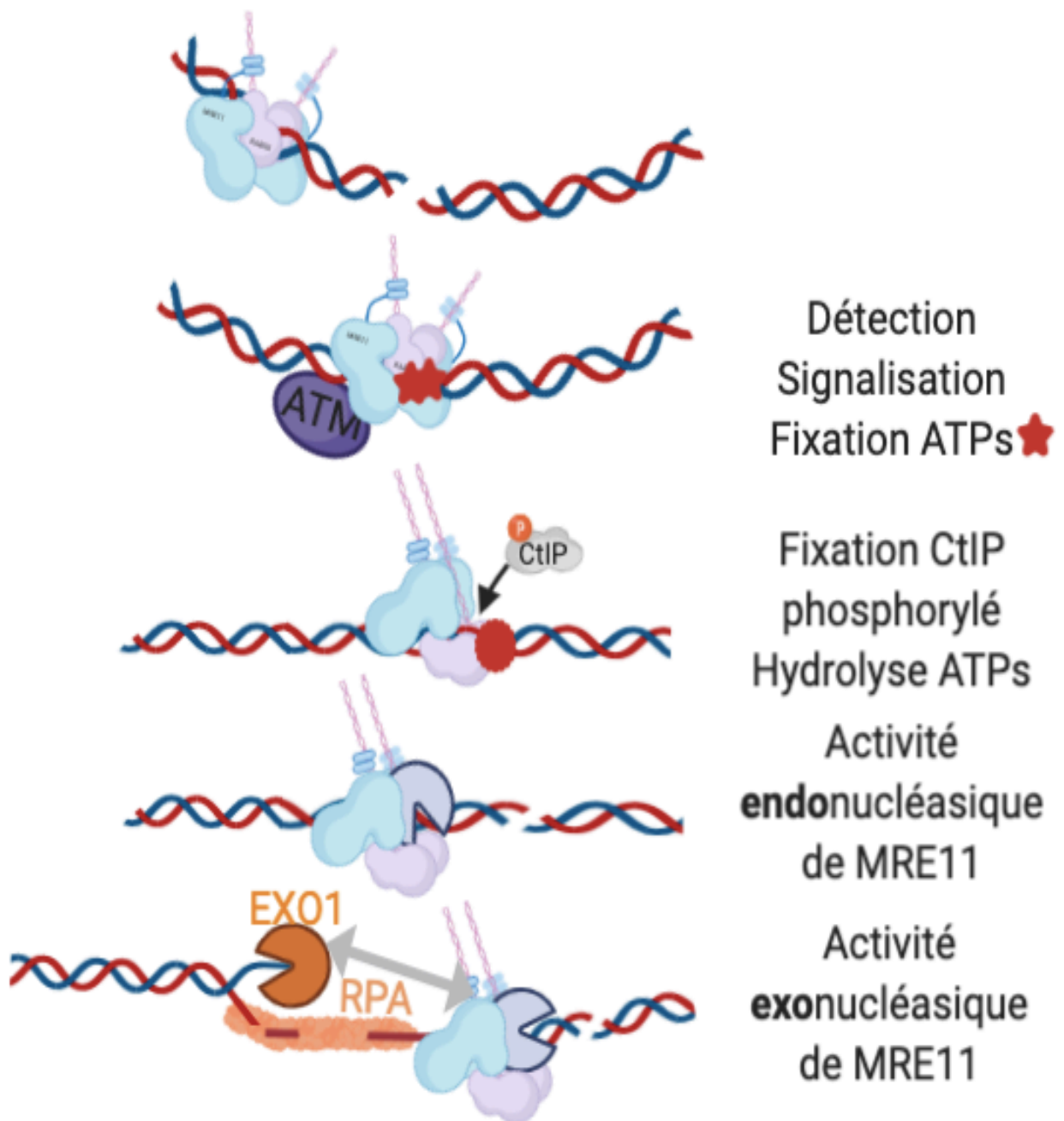


Figure 19 : Activités du complexe MRN. La reconnaissance d'une cassure double brin par le complexe MRN induit l'activation d'ATM. La fixation de CtIP phosphorylée entraînerait l'hydrolyse des ATPs portés par RAD50, un changement conformationnel de MRN et l'activation de l'activité endonucléasique de MRE11 à 100-200 paires de base de la cassure. La coupure est étendue de part et d'autre par MRE11 dans le sens 3'-5' et par EXO1/DNA2 dans le sens 5'-3'. Le segment simple brin généré est recouvert par RPA.

Enfin, MRN agit comme un support pour la RH, capable d'interagir physiquement avec Exo1 et de clamber le brin invasif et le brin matrice indépendamment de ses activités nucléasiques. Néanmoins, le complexe MRN intervient aussi durant le NHEJ. Dans les cellules humaines, l'inhibition en phase G2 de l'activité endonucléasique de MRE11 bloque la RH mais pas le NHEJ. Au contraire, l'inhibition de l'activité exonucléasique empêche la RH et le NHEJ suggérant que la résection ayant lieu après la coupure endonucléasique bloque la réparation par NHEJ. Le complexe MRN est également important pour la réparation des cassures double brin en phase G1 durant laquelle une longue résection n'a pas lieu mais une résection sur une courte distance peut précéder le NHEJ. Dans ce cas, l'activité endonucléasique du complexe n'est pas requise mais l'inhibition de l'activité exonucléasique réduit l'efficacité de réparation (**Shibata *et al.*, 2014, Mol Cell**). La manière dont ce processus est initié sans activité endonucléasique n'est pas encore claire.

II.2.1.4 Rapprochement

Chez la levure, un mutant de la fonction nucléasique de Mre11 montre un délai dans la résolution des foci Rad51 après induction par irradiation, suggérant que le complexe MRX(N) peut intervenir aussi bien avant qu'après la formation du nucléofilament (**Mirzoeva and Petrini, 2001, Mol Cell Biol**). En effet, il semblerait qu'une autre fonction du complexe MRN soit de coordonner et rapprocher les extrémités d'ADN à réparer (**van der Liden *et al.*, 2009, Nucleic Acids Res**). La fonction de rapprochement du complexe MRN est attribuée au domaine en bobine enroulée de Rad50 et nécessite le domaine de crochet de zinc (**Zhu *et al.*, 2018, Proc Natl Acad Sci USA**) qui permettrait une dimérisation intercomplexe (cf partie II.1.5). Cependant, l'analyse de la cohésine eucaryote et de la condensine procaryote, toutes deux appartenant comme Rad50 à la famille des protéines SMC, a permis de mettre en évidence une activité différente de celle du simple rapprochement des extrémités d'ADN. Il est suggéré que l'ADN serait piégé au niveau de l'anneau de la structure puis lors de l'adoption par Rad50 d'une forme de tige rigide avec l'hydrolyse de l'ATP, l'ADN serait transféré vers la tête globulaire où serait contenu un autre fragment d'ADN. Les bras flexibles des protéines de la famille SMC permettraient donc une translocation de l'ADN en réalisant de grandes boucles sur la chromatine plutôt qu'en rapprochant des fibres d'ADN (**Vazquez Nunez *et al.*, 2019, Mol Cell**).

II.2.2 MRN et réplication

L'activité du complexe MRN ne se limite pas à la réparation des cassures double brin. Au niveau d'une fourche arrêtée ou endommagée, le complexe MRN joue un rôle crucial en permettant la résection d'un brin naissant, le recul de la fourche et son redémarrage. Le complexe MRN aide donc à l'orchestration de la réponse au stress des fourches de réplication.

Durant la réplication les nucléosomes sont déplacés et rapidement repositionnés dans le sillage de la fourche. La rencontre entre un réplisome et une barrière répllicative peut entraîner un détachement provisoire des hélicases et polymérases. Ce détachement peut conduire à la formation d'une longue fibre simple brin d'ADN, recouverte par la protéine RPA, le recrutement de MRN au niveau de la chromatine naissante et l'activation de la voie ATR qui phosphoryle RAD50 à la position S635 (**Gatei *et al.*, 2014, Human Molecular Genetics**). Le complexe MRN favorise le remodelage de la chromatine, facilitant la résection d'un long segment d'ADN naissant et le chargement de cohésines au niveau de la fourche arrêtée. Cette coordination entre la résection et le chargement des cohésines par le complexe MRN facilite le redémarrage des fourches et les échanges chromosomiques entre chromatides sœurs (**Delamarre *et al.*, 2020, Mol Cell**). Le détachement des hélicases et polymérases peut également entraîner l'apparition de structures d'ADN double brin particulières reconnues par Ku qui sera par la suite libéré sous l'action du complexe MRN (**Teixeira-Silva *et al.*, 2017, Nature Communications**) (cf partie I.3.2.3).

II.2.3 MRN et réponse immunitaire innée

Le complexe MRN intervient dans le signalement et la défense face à une infection virale au cours de laquelle une activation locale d'ATM (mais pas globale comme dans le cas d'une cassure de l'ADN) est initiée par le complexe MRN. Les réponses biochimiques de MRN permettent donc à la cellule de différencier une réponse aux dommages à l'ADN suite à une cassure d'une réponse induite par l'entrée d'un génome étranger dont il faudra bloquer la réplication. L'ADN viral, une fois reconnu par le complexe MRN, conduit à la production d'interférons de type I (IFNs) via l'activation du facteur nucléaire kappa B (NF- κ B). Contrairement à NBS1, MRE11 et RAD50 sont tous les deux indispensables à la production d'IFNs (**Kondo *et al.*, 2013, Proc Natl Acad Sci**). De même, dans les cellules dendritiques

(cellules présentatrices d'antigènes), lorsque RAD50 rencontre un ADN cytosolique, MRN forme un complexe avec CARD9. Ce complexe ADN viral-RAD50-CARD9 stimule la production de la cytokine pro-inflammatoire IL-1B via la voie NF-κB (**Roth *et al.*, 2014, Nat Immunol**).

Le complexe MRN présente un tel rôle clé que les virus expriment certaines protéines qui le ciblent directement afin de l'inactiver, favoriser sa dégradation et ainsi faciliter l'intégration de leur génome dans la cellule hôte qu'ils infectent (**Stracker *et al.*, 2002, Nature ; Lilley *et al.*, 2007, Trends in Microbiology**). Les facteurs de transcription et de réplication E2 produits par le virus HPV-16 ou la protéine LANA (latency associated nuclear antigen) produite par le virus KHSV (Kaposi sarcoma herpesvirus) sont des exemples de molécules virales ciblant le complexe MRN de la cellule hôte. De plus, l'antigène T de SV40 interagit avec la partie N-terminale de NBS1. Sans influencer les fonctions de NBS1 dans la réparation, l'interaction de l'antigène grand T avec NBS1 inhiberait le contrôle de l'allumage des origines virales et cellulaires de réplication. Un environnement dans lequel le génome viral peut être amplifié au maximum serait créé, mettant en évidence le rôle de suppresseur de re-réplication de NBS1 (**Wu *et al.*, 2004, Genes Dev**).

II.2.4 MRN et télomères

Les télomères constituent les extrémités des chromosomes composées de séquences d'ADN répétées non codantes. Protégés par une association protéique appelée shelterin, les télomères permettent aux cellules de distinguer ces extrémités télomériques d'une extrémité d'ADN générée par cassure et d'éviter leur fusion ou leur dégradation. La longueur des télomères est maintenue par la télomérase, une reverse transcriptase inverse active dans les cellules des levures et chez les mammifères, dans les cellules souches et dans de nombreuses cellules cancéreuses (**Shippen-Lentz *et al.*, 1990, Science**). Dans la plupart des cellules somatiques, la télomérase est inactive, limitant ainsi les phénomènes de tumorigénèse.

L'importance du complexe MRX(N) dans le maintien des télomères a été reconnue après avoir constaté que chez la levure, la suppression de l'un des facteurs du complexe entraîne le raccourcissement des télomères et la sénescence des cellules (**Kironmai *et al.*, 1997, Genes Cells** et **Chamankhah *et al.*, 1999, Nucleic Acids Res**). Plus précisément, le maintien des télomères dépend aussi de Tel1 (ATM). En l'absence de Mre11, un défaut d'ATM est induit entraînant l'abolition du recrutement de la télomérase durant la phase S puis un

raccourcissement des télomères. Le complexe MRX régulerait donc la longueur des télomères en y recrutant la télomérase (**Takata *et al.*, 2005, Mol Cell**). Toutefois, dans des cellules mammifères, le complexe MRN ne semble pas exercer un effet aussi important sur l'homéostasie de la longueur des télomères. Des expériences sur des fibroblastes de patients NBS humains présentant des télomères raccourcis ont été menées. Dans ces cellules, la co-expression de NBS1 et de la télomérase entraîne des télomères plus longs qu'après l'expression de la télomérase seule (**Ranganathan *et al.*, 2001, Curr Cell**). De plus, dans des cellules cancéreuses, l'inhibition de MRE11 ou de NBS1 réduit la longueur des télomères mais cette inhibition n'a aucun effet dans des cellules qui n'expriment pas la télomérase (**Chai *et al.*, 2006, EMBO**). Ces résultats suggèrent donc, comme chez la levure, que le complexe MRN faciliterait l'activité de la télomérase. En outre, il existe un mécanisme alternatif d'élongation des télomères (alternative lengthening of telomeres – ALT) qui, en promouvant des mécanismes de recombinaison homologues entre séquences télomériques, permet à des cellules humaines immortalisées de maintenir la taille de leurs télomères indépendamment de la télomérase. L'inhibition de NBS1 dans des cellules utilisant le système ALT de maintenance des télomères entraîne un raccourcissement des télomères (**Zhong *et al.*, 2007, J Biol Chem**). Les protéines du complexe MRN semblent donc nécessaires à l'activité du système ALT.

Chez l'homme, la protection des télomères dépend du facteur TRF2 (TTAGGG repeat binding factor 2), capable de remodeler les télomères en boucle t (t-loops). Le complexe MRN peut s'associer à TRF2 (**Zhu *et al.*, 2000, Nature Genetics**). L'inactivité de la protéine TRF2 entraîne des télomères dysfonctionnels non protégés, reconnus comme des cassures double brin, provoquant l'activation d'ATM, la phosphorylation de CHK2, la formation de foci télomériques (TIF, telomere dysfunction-induced foci) et la potentielle fusion des chromosomes par le NHEJ (**Celli *et al.*, 2005, Nat Cell Biol**). L'analyse de souris double KO Mre11/Trf2 a démontré que MRN détecte et signale via la phosphorylation d'ATM un dysfonctionnement télomérique de manière indépendante de ses fonctions nucléasiques (**Dimitrova et de Lange, 2009, Mol Cell Biol** et **Attwool *et al.*, 2009, Mol Cell Biol**). Mais la suppression de TRF2 libérerait également l'activité exonucléasique 3'-5' de MRE11 permettant de générer des substrats télomériques compatibles à une jonction par LIG4 (**Deng *et al.*, 2009, Nature**).

En revanche, il apparaît que l'absence de RAD50 dans des MEFs n'entraîne pas directement d'instabilité télomérique (**de Lange et Petrini, 2000, Cold Spring Harb Symp Quant Biol**). Il semble donc que le complexe MRN puisse jouer un rôle important dans la prise en charge des télomères dysfonctionnels sans participer à la stabilité des télomères normaux.

Les télomères sont des régions difficiles à répliquer et les fourches de réplication y sont régulièrement bloquées (**Sfeir et al., 2009, Cell**). Chez *S. pombe*, en absence de télomérase, Ku, MRN-Ctp1 et la recombinaison homologue sont essentiels pour le traitement des fourches arrêtées. Dans ce contexte, Ku pourrait se fixer aux télomères cassés en cours de réplication, MRN-Ctp1 pourrait ensuite libérer Ku et initier la résection, également dépendante de Exo1. La réparation de la zone s'effectuerait par la suite par un mécanisme basé sur la recombinaison (**Matmati et al., 2020, Cell Reports**).

II.2.5 MRN et maladies

Le complexe MRN est indispensable à la survie cellulaire chez les mammifères tandis que la levure supporte des mutations entraînant la suppression d'un des partenaires du complexe (**Stracker et al., 2011, Nat Rev Mol Cell Biol**).

II.2.5.1 Chez l'homme

- Mutations génétiques dans un des facteurs du complexe MRN

Les trois composantes du complexe MRN sont codées par des gènes essentiels. Chez l'homme, des mutations bialléliques hypomorphiques de n'importe lequel de ces trois gènes entraînent un syndrome d'instabilité génomique (**Rahman et al., 2020, Cells**).

Les patients décrits avec des mutations bialléliques dans le gène *MRE11* présentent une ATLD (ataxia telangectasia (AT) like disorder) caractérisée par une dégénérescence cérébelleuse progressive, des mouvements anormaux des yeux, une augmentation des anomalies chromosomiques spontanées, une sensibilité accrue aux rayonnements ionisants et un déficit immunitaire (**Stewart et al., 1999, Cell ; Uchisaka et al., 2009, J. Pediatr et Matsumoto et al., 2011, DNA Repair**). Des patients avec une polyarthrite rhumatoïde présentant un vieillissement précoce des lymphocytes T, montrent un niveau faible de MRE11, des dommages télomériques et une augmentation des marqueurs de sénescence. La

surexpression de MRE11 dans ces cellules réverse le phénotype. MRE11 pourrait donc être une cible thérapeutique dans le traitement du vieillissement des cellules immunitaires.

Des mutations dans le gène *NBS1* entraîne l'apparition d'un Nijmegen breakage syndrome (NBS), maladie autosomique récessive rare, dont les caractéristiques cliniques principales sont la microcéphalie progressive, une petite taille et la présence de dysmorphies faciales (nez proéminent, grandes oreilles). De plus, les patients NBS1 présente une immunodéficience (diminution des IgG et IgA liée à un défaut de la commutation isotypique des immunoglobulines), des infections pulmonaires récurrentes, une radio sensibilité et une prédisposition aux cancers dans la seconde décennie de vie. Une mutation récurrente représente la majorité des causes génétiques de NBS. Celle-ci consiste en la délétion 657del5 induisant l'expression d'une protéine tronquée capable de maintenir partiellement les fonctions de la protéine. Cette protéine raccourcie possède des domaines FHA et BRCT ainsi qu'un fragment de la partie C-terminale capable d'interagir avec MRE11. Les patients NBS présentent une prédisposition à développer des translocations touchant les chromosomes 7 et 14, signe de l'instabilité chromosomique (**Chrzanowska *et al.*, 1995, Am J Med Genet**).

Seuls deux patients portant des mutations bialléliques dans le gène *RAD50* ont jusqu'ici été décrits. Avec les caractéristiques cliniques d'un patient NBS, le premier patient n'a pourtant jamais développé d'infections sévères, a un niveau d'immunoglobulines normal et n'a pas développé de cancer du système lymphoïde avant l'âge de 23 ans (**Waltes *et al.*, 2009, American Journal of Human Genetics**). Il s'est avéré que ce patient présente deux mutations dans le gène *RAD50*. La première héritée de sa mère entraîne l'apparition d'un codon stop prématuré (exon 21, c.3277C>T ; p.R1093X) tandis que la seconde, provenant du père, change le codon stop en un codon tyrosine (exon 25, c.3939A>T). Il en découle l'expression d'une protéine non fonctionnelle, plus longue que la protéine sauvage de 66 acides aminés, conduisant à une déstabilisation de la protéine. Les cellules de ce patient présentent un défaut d'activation de la voie ATM se manifestant par une forte radio sensibilité, un défaut de checkpoint G1/S et une accumulation de cellules en G2 après irradiation. Le second patient décrit est issu d'une famille consanguine et présente des signes de dysmorphie faciale, une petite taille et une microcéphalie (**Ragamin *et al.*, 2020, American Journal of Medical Genetics**). Il ne montre pas non plus de signes d'infections récurrentes. L'étude de son statut génétique indique la présence d'une mutation homozygote dans l'exon 15 de *RAD50* (c.2524G>A, substitution d'une guanine en adénosine à la position 2524) induisant un épissage aberrant de l'ARN messager, une troncature prématurée de la protéine et une perte importante de la fonction de la protéine. Cette mutation est également

hypomorphe car une très faible proportion du gène est correctement épissé. Ceci conduit à une réduction très importante de l'expression d'une forme sauvage de RAD50. Cette mutation, héritée de ses parents, n'est pas un polymorphisme connu. Comme des cellules AT, les cellules du patient présentent un défaut de signalisation des dommages liés aux radiations.

- Complexe MRN et cancers

Lorsque le complexe MRN présente un défaut d'activité ou une diminution d'expression, il entraîne une accumulation des dommages à l'ADN et favorise la transformation des cellules en lignée maligne. Le complexe MRN est de ce fait impliqué dans de nombreux cancers. Il est fréquemment retrouvé absent ou muté dans les cellules issues de cancers colorectaux (**Ho *et al.*, 2016, PLoS ONE**), gastriques (**Altan *et al.*, 2016, Anticancer Res**), du sein (**Yuan *et al.*, 2012, J Natl Cancer Inst**), des ovaires (**Brandt *et al.*, 2017, BMC cancer**), du poumon (**Wang *et al.*, 2018, Clin Cancer Res**) et issues du syndrome de Lynch (**Alemayehu *et al.*, 2007, Eur J Hum Genet**). Des mutations hétérozygotes *de novo* de *MRE11* sont associées avec une augmentation de la susceptibilité au cancer colorectal et une augmentation de l'instabilité des séquences microsatellites.

Au sein des cellules cancéreuses, le niveau d'expression de MRN (augmenté ou diminué) influence la réponse aux traitements anti-cancéreux (chimiothérapie, radiothérapie) et le degré d'apoptose induite (**Situ *et al.*, 2019, Int J Mol Sci**). Une augmentation de l'expression de RAD50 dans des cellules cancéreuses issues d'une tumeur colorectale est associée à un mauvais pronostic (**Chen *et al.*, 2018, Neoplasma**) car elle augmente la résistance des cellules aux radiations alors que son inhibition les sensibilise. Le complexe MRN pourrait donc être une cible pour la médecine de précision, pour de nouvelles thérapies et un biomarqueur prometteur dans la prédiction de la réponse au traitement.

La conservation du complexe MRN à travers tous les domaines de la vie et les conséquences catastrophiques que peuvent provoquer une anomalie de ses fonctions prouvent que le complexe MRN est un acteur essentiel du maintien de la stabilité génomique (**Syed et Tainer, 2018, annual review of biochemistry**).

II.2.5.2 Modèles murins

Les modèles murins KO pour *Mre11*, *Rad50* ou *Nbs1* sont létaux à l'état embryonnaire (**Xiao et Weaver, 1997, Nucleic Acids Res ; Luo et al., 1999, Proc Natl Acad Sci et Zhu et al., 2001, Curr Biol**) mais des modèles mimant les mutations hypomorphiques retrouvées chez l'homme ont été générés. Les phénotypes développés par ces souris sont moins sévères que ceux rencontrés chez l'homme mais les modèles d'inhibition cellulaire ou tissulaire peuvent récapituler divers aspects de la maladie humaine y compris l'immunodéficience, la prédisposition au cancer et des anomalies des lignées neuronale et germinale.

CHAPITRE III : Peignage moléculaire

III.1 Généralités, principe

Le peignage moléculaire (molecular combing) est une technique qui permet de visualiser l'ADN à l'échelle moléculaire (**Bensimon *et al.*, 1994, Science**). L'ADN est extrait et purifié à partir de cellules emprisonnées dans un gel d'agarose. Une lame de verre recouverte de silane vinylique, est plongée dans la solution contenant l'ADN. En fonction du pH de cette solution, des interactions électrostatiques entre un fragment d'ADN chargé négativement et la lamelle chargée positivement sont possibles. Elles aboutissent à la fixation spontanée à la lamelle d'une extrémité des molécules individuelles d'ADN. En remontant lentement la lame hors de la solution, une force exercée par le ménisque air – liquide sur la lamelle de verre permet d'emporter les fragments d'ADN fixés. Ils sont alors étirés à vitesse constante (300 $\mu\text{m/s}$) sous forme de fibres parallèles alignées. Le facteur d'étirement étant constant et indépendant du contenu de la séquence (absence de biais lié au pourcentage en GC par exemple), une relation directe existe entre la longueur des fibres et la taille en kilobase de l'ADN peigné (2 kb/ μm) (Figure 20). La taille des molécules peignées peut aller de quelques kilobases à plusieurs mégabases (**Conti *et al.*, 2001, Curr Protoc Cytom**).

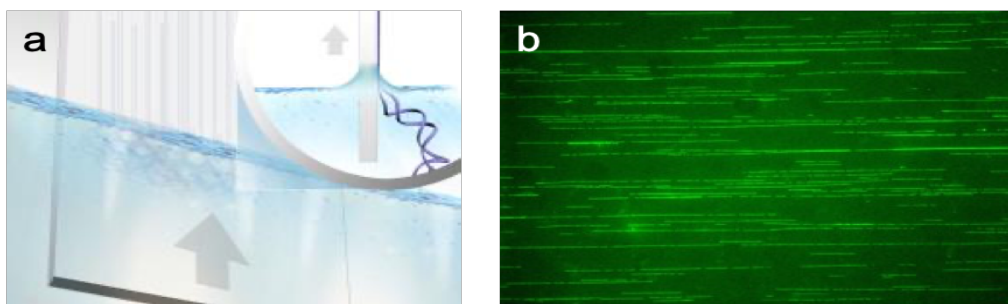


Figure 20 : Le peignage moléculaire. a) Système d'étirement des molécules individuelles d'ADN à l'interface air-liquide. Une lame recouverte de silane vinylique, plongée dans une solution d'ADN est ressortie à vitesse constante. b) Fibres d'ADN peignées et marquées au yoyo, agent intercalant de l'ADN (Source : Genomic Vision).

III.2 Applications

III.2.1 Hybridation *in situ*

La technique est compatible avec l'ADN prémarqué et l'hybridation *in situ*. En effet, l'ADN peigné peut être hybridé avec une combinaison de sondes fluorescentes de différentes taille et couleur, spécifique d'une région donnée à analyser (Fluorescence in situ hybridization – FISH). Un « Code Morse Spécifique » est ainsi créé, permettant de mettre en évidence les potentiels grands réarrangements (supérieurs à 4 kb) de la région comme les amplifications, délétions, répétitions, inversions et translocations (Figure 21) (Michalet *et al.*, 1997, **Science**).

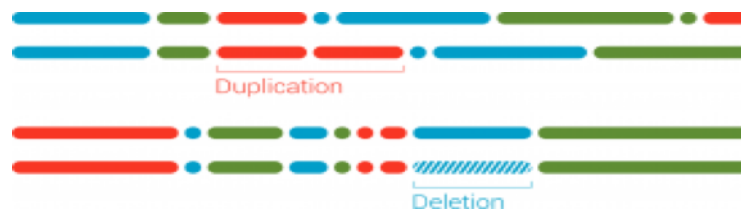


Figure 21 : Code Morse Génétique. Association de sondes spécifiques d'une région donnée afin de détecter de potentiels grands réarrangements sur l'ADN peigné (Source : Genomic Vision).

III.2.2 Etude de la réplication

La technologie du peignage moléculaire permet également l'analyse spatio-temporelle de la réplication de l'ADN (Replication Combing Assay - RCA) (Herrick *et al.*, 1999, **Biochimie**). Pour ce faire, deux pulses successifs de nucléotides halogénés (chloro-deoxyuridine - CldU et iododeoxyuridine - IdU) sont réalisés sur des cellules en cours de réplication. Ces nucléotides sont incorporés au fur et à mesure de la progression bidirectionnelle des fourches de réplication de part et d'autre de l'origine de réplication. Après peignage des fibres et dénaturation de l'ADN double brin en filament simple brin, le CldU et l'IdU sont détectés par immuno-fluorescence sur les lamelles à l'aide d'anticorps spécifiques couplés (directement ou non) à des fluorochromes (Caburet *et al.*, 2002, **Trends in biotechnology**). Ainsi, trois types de signaux peuvent être obtenus (Figure 22) selon le moment d'allumage de l'origine de réplication (avant les pulses, pendant le premier pulse ou durant le second). La vitesse de réplication, la symétrie des fourches et les distances inter origines sont ainsi mesurables.

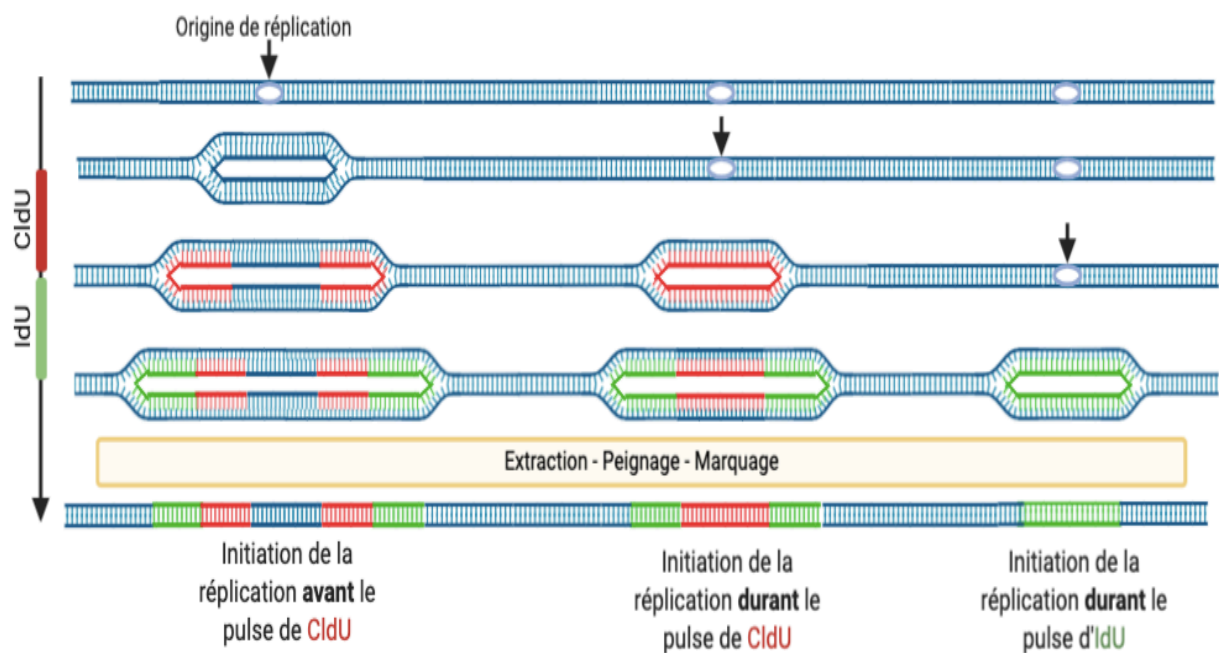


Figure 22 : Analyse des paramètres de réplication par peignage moléculaire. La détection puis la mesure des signaux de CldU et d'IdU incorporés permettent de mesurer la vitesse des fourches de réplication.

Les méthodologies de RCA et de FISH sur de l'ADN peigné peuvent être combinées donnant accès aux paramètres de réplication à des loci spécifiques. Ainsi, la réplication de l'ADN ribosomal a pu être analysée (**Pasero *et al.*, 2002, Genes & Development**) tout comme la réplication télomérique (**Sfeir *et al.*, 2009, Cell** ; **Gali *et al.*, 2019, Methods Mol Biol**) et péricentromérique (**Mendez-Bermudez *et al.*, 2018, Molecular Cell**).

III.2.3 Etude de la résection

Le peignage moléculaire permet d'analyser d'autres mécanismes comme celui de la résection de l'ADN. Après une cassure double brin, trois principales voies de réparation sont envisageables pour la cellule, dépendantes ou non de la présence de séquences homologues. La réparation par recombinaison homologue utilise de longues séquences homologues ; de courtes zones d'homologie permettent une réparation par le système de jonction médiée par microhomologie (micro-homology-mediated end joining - MMEJ), tandis que la réparation par jonction d'extrémités non homologues (NHEJ) s'effectue sans le besoin d'aucune homologie (cf. chapitre réparation). L'événement clé qui permet l'orientation du choix de la voie de réparation est la résection (**Huertas, 2010, Nat Struct Mol Biol**). Il consiste en la dégradation d'un brin d'ADN dans le sens 5'-3' de part et d'autre de la cassure, créant un

filament 3' simple brin sortant. Le NHEJ est inhibé par la résection, favorisant ainsi la recombinaison homologue ou la réparation par MMEJ (Symington et Gautier, 2011, *Annu Rev Genet*).

Décrite en 2014, la technique du SMART (Single-Molecule Analysis of Resection Tracks) utilise le peignage moléculaire afin d'estimer les paramètres de résection, notamment la longueur des brins d'ADN résectés. Pour ce faire, un long pulse de BrdU est mené sur les cellules (24 à 48 heures), assurant le marquage d'au moins un brin par molécule d'ADN. Après cassure double brin, la résection des deux extrémités de part et d'autre de la cassure permet la création de fibres simple brin d'ADN exposant le BrdU qu'elles contiennent. Sans étape de dénaturation, ce dernier peut alors être détecté par un anticorps spécifique (Figure 23) (Cruz-Garcia *et al.*, 2014, *Cell Reports*).

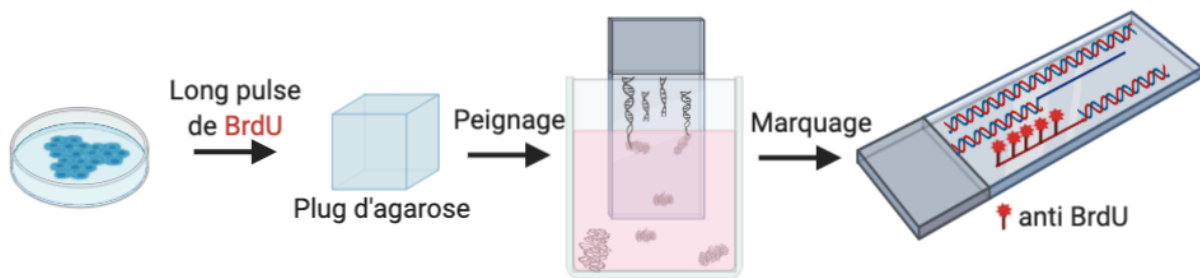


Figure 23 : Technique du SMART. Le peignage moléculaire permet d'estimer la résection en mesurant la longueur des fibres simple brin après induction ou non de dommages à l'ADN.

Durant la réplication, un stress réplcatif (par traitement à l'hydroxyurée par exemple) entraîne l'arrêt des fourches dont le redémarrage est assuré par une étape de résection, sur une ou plusieurs extrémités. Son analyse peut être faite en estimant la réduction de la longueur des segments de CldU ou d'IdU après traitement (Ray Chaudhuri *et al.*, 2016, *Nature* ; Coquel *et al.*, 2018, *Curr Opin Immunol*) (Figure 24).

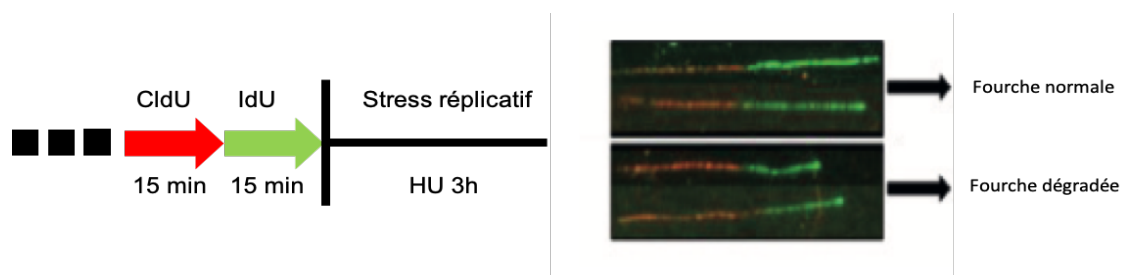


Figure 24 : Analyse de la résection au cours de la réplication après induction d'un stress réplcatif. Le calcul du rapport des longueurs IdU/CldU s'écarte de 1 lorsqu'une fourche est dégradée (Adaptée de Ray Chaudhuri *et al.*, 2016, *Nature*).

III.2.4 *Mesure de la taille des télomères*

Une étude récente propose d'utiliser le peignage moléculaire pour mesurer la taille des télomères (TCA – Telomere lengths Combing Assay). Après étirement des fibres d'ADN, les régions télomériques sont détectées au moyen d'une sonde télomérique spécifique (sonde PNA – peptide nucleic acids). La mesure de la taille des signaux permet d'obtenir la distribution de la longueur des télomères dans une population cellulaire (**Kahl *et al.*, 2020, Front Cell Dev Biol**). A l'avenir, l'utilisation de sonde subtélomérique pourrait permettre de mesurer la longueur spécifique des télomères de chaque chromosome.

ARTICLE

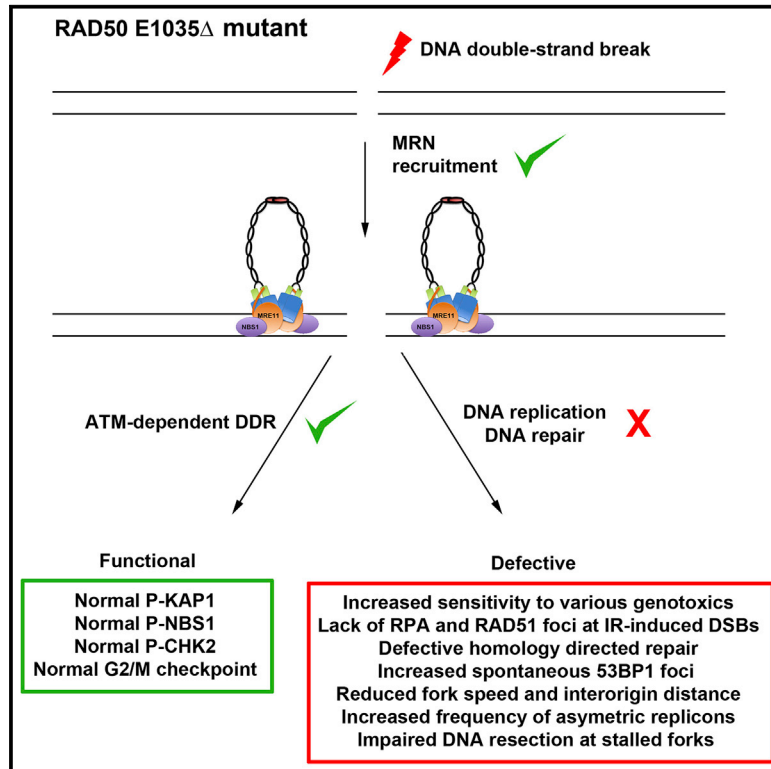
Le travail de recherche du laboratoire est basé sur l'analyse de patients présentant des symptômes cliniques évoquant un défaut de réparation de l'ADN dont des échantillons biologiques sont adressés pour investigation. Ainsi, un patient avec un retard du développement associé à une insuffisance médullaire a été suivi en Turquie. Des prélèvements de ce patient ont été délivrés puis traités au laboratoire et des lignées cellulaires stables (lymphocytes B transformés par le virus de l'EBV et fibroblastes immortalisés par expression ectopique de la télomérase) ont pu être établies permettant des études phénotypiques et génétiques. Le séquençage de l'exome du patient a révélé la présence de mutations bialléliques dans le gène *RAD50*. La protéine RAD50 est un des membres du complexe MRN avec ses partenaires MRE11 et NBS1. Seul deux patients ayant des mutations dans le gène *RAD50* ont été jusqu'ici rapportés et une des mutations portées par ce troisième patient impacte le domaine en bobine enroulée de la protéine en y entraînant la délétion d'un acide aminé unique, déstabilisant l'organisation en heptades répétées du domaine. Le domaine en bobine enroulée est une structure longue (500 Ångströms environ), mobile et peu rigide rendant difficile la détermination de sa forme. Malgré de récents progrès dans l'analyse structurale de RAD50 et de ses différents partenaires au sein du complexe MRN, le domaine en bobine enroulée reste une structure avec des fonctions mal définies, notamment dans la régulation des activités du complexes MRN et plus spécifiquement des activités nucléasiques de MRE11. C'est pourquoi l'étude plus poussée de ce patient s'est avérée particulièrement intéressante. L'analyse phénotypique des cellules du patient est à la base de ce travail de thèse dont les résultats ont fait l'objet d'un manuscrit intitulé « A disease-causing single amino-acid deletion in the coiled-coil of RAD50 impairs MRE11 complex functions in yeast and humans », Chansel Da Cruz *et al.*, 2020 publié dans Cell Reports et repris ci-après.

Le complexe MRN permet la détection, la signalisation et l'initiation de la réparation des cassures double brin chez les eucaryotes. Il intervient notamment durant la recombinaison homologue. L'analyse des cellules du patient a permis de mettre en évidence une mutation séparation de fonction, impactant la réparation, la réplication et la résection mais maintenant le recrutement du complexe au dommage et la réponse aux dommages de l'ADN dépendante d'ATM. Ces observations suggèrent que la mutation influence la résection des extrémités

d'ADN dépendante de MRE11. L'étude de la mutation observée chez le patient dans d'autres modèles a permis de conforter l'impact de la mutation. En effet, les résultats obtenus dans les cellules du patient ont été approfondis *in vitro* par des expériences avec des protéines recombinantes purifiées. Ces dernières ont été réalisées par Petr Cejka (Institut de biochimie, Zürich, Suisse). D'autre part, la mutation correspondante a été introduite chez la levure. Les souches ont été élaborées et analysées par Marcel Hohl au sein de l'équipe de John Petrini (Memorial Sloan-Kettering Cancer Center, New-York).

A Disease-Causing Single Amino Acid Deletion in the Coiled-Coil Domain of RAD50 Impairs MRE11 Complex Functions in Yeast and Humans

Graphical Abstract



Authors

Marie Chansel-Da Cruz, Marcel Hohl, Ilaria Ceppi, ..., Petr Cejka, John H.J. Petrini, Patrick Revy

Correspondence

patrick.revy@inserm.fr

In Brief

Chansel-Da Cruz et al. provide evidence that a mutation in the human RAD50 coiled coil located away from the MRE11 interaction interface uncouples the signaling function of the MRN complex from its broken DNA end processing activities. This demonstrates the crucial role of the RAD50 coiled coil in the MRE11 complex regulation.

Highlights

- A human RAD50 mutant impairs DNA repair but not ATM-dependent DDR
- A single amino acid deletion disrupts the coiled-coil structure of RAD50
- A Rad50 mutant yeast strain exhibits an extremely severe thermosensitive phenotype



Article

A Disease-Causing Single Amino Acid Deletion in the Coiled-Coil Domain of RAD50 Impairs MRE11 Complex Functions in Yeast and Humans

Marie Chansel-Da Cruz,^{1,2,3} Marcel Hohl,^{4,9} Ilaria Ceppi,^{5,6,9} Laëtitia Kermasson,^{1,2} Laurence Maggiorella,³ Mauro Modesti,⁷ Jean-Pierre de Villartay,^{1,2} Talia Ileri,⁸ Petr Cejka,^{5,6,10} John H.J. Petrini,^{4,10} and Patrick Revy^{1,2,11,*}

¹INSERM UMR 1163, Laboratory of Genome Dynamics in the Immune System, Equipe Labellisée la Ligue contre le Cancer, Paris, France

²University of Paris-Sorbonne Paris Cité University, Imagine Institute, Paris, France

³Genomic Vision, R&D Innovation Department, Bagneux, France

⁴Molecular Biology Program, Memorial Sloan Kettering Cancer Center, New York, NY 10065, USA

⁵Institute for Research in Biomedicine, Università della Svizzera Italiana (USI), Faculty of Biomedical Sciences, Via Vincenzo Vela 6, 6500 Bellinzona, Switzerland

⁶Department of Biology, Institute of Biochemistry, Eidgenössische Technische Hochschule (ETH), 8093 Zürich, Switzerland

⁷Cancer Research Center of Marseille, CNRS UMR7258, INSERM U1068, Institut Paoli-Calmettes, Aix-Marseille Université, Marseille, France

⁸Ankara University School of Medicine, Pediatric Hematology and Oncology, Ankara, Turkey

⁹These authors contributed equally

¹⁰These authors contributed equally

¹¹Lead Contact

*Correspondence: patrick.revy@inserm.fr

<https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.108559>

SUMMARY

The MRE11-RAD50-NBS1 complex plays a central role in response to DNA double-strand breaks. Here, we identify a patient with bone marrow failure and developmental defects caused by biallelic *RAD50* mutations. One of the mutations creates a null allele, whereas the other (*RAD50*^{E1035Δ}) leads to the loss of a single residue in the heptad repeats within the RAD50 coiled-coil domain. This mutation represents a human RAD50 separation-of-function mutation that impairs DNA repair, DNA replication, and DNA end resection without affecting ATM-dependent DNA damage response. Purified recombinant proteins indicate that *RAD50*^{E1035Δ} impairs MRE11 nuclease activity. The corresponding mutation in *Saccharomyces cerevisiae* causes severe thermosensitive defects in both DNA repair and Tel1^{ATM}-dependent signaling. These findings demonstrate that a minor heptad break in the RAD50 coiled coil suffices to impede MRE11 complex functions in human and yeast. Furthermore, these results emphasize the importance of the RAD50 coiled coil to regulate MRE11-dependent DNA end resection in humans.

INTRODUCTION

DNA double-strand breaks (DSBs) are considered the most toxic form of DNA damage. Although unrepaired DSBs can cause cell death, improperly repaired DSBs represent a source of mutation and translocation that challenges genome stability and can lead to cancer development (Scully et al., 2019). MRE11-RAD50-NBS1 (MRN; Mre11-Rad50-Xrs2 [MRX] in yeast) is a conserved complex that plays a central role in the sensing of and response to DSBs (Lisby et al., 2004; Mirzoeva and Petrini, 2001). MRN is one of the first molecular entities detected at DSBs, where it activates the ataxia telangiectasia mutated (ATM) kinase to trigger DNA damage response (DDR) signaling to induce cell-cycle checkpoints and apoptosis (Lisby et al., 2004; Stracker and Petrini, 2011). The MRN complex also influences DSB repair via the endo- and exonuclease activities of MRE11 and initiates DNA end resection to generate, in concert with other nucleases, single-strand DNA (ssDNA) ends that

drive homology-directed repair (HDR) (Scully et al., 2019; Syed and Tainer, 2018).

RAD50 belongs to the highly conserved structural maintenance of chromosome (SMC) family of proteins (de Jager et al., 2004; Hopfner and Tainer, 2003). RAD50 possesses an extended coiled-coil domain that folds back upon itself to form an intramolecular, antiparallel coiled-coil structure of about 500 Å that leads to juxtaposition of the N- and C-terminal Walker A and B domains and generates a functional ATPase that directly interacts with MRE11. The coiled-coil structure, which is conserved across the SMC proteins and all known Rad50 orthologs (de Jager et al., 2004; Paull, 2018; Stracker and Petrini, 2011; Syed and Tainer, 2018), comprises a heptad repeat pattern wherein the first and the fourth residues are hydrophobic to allow the association of antiparallel helices via their hydrophobic faces (de Jager et al., 2001; Truebestein and Leonard, 2016; van Noort et al., 2003). The apex of the RAD50 coiled coil consists of



a zinc (Zn)-hook domain by which two MRE11-RAD50 complexes can dimerize to form intra- and intermolecular complexes that have been proposed to bridge DNA ends (Hohl et al., 2015; Hopfner, 2014; Park et al., 2017; Paull, 2018; Stracker and Petrini, 2011; Syed and Tainer, 2018; Tatebe et al., 2020). It has also been recently suggested that MRE11-RAD50 complexes could promote DNA tethering of sister chromatids at stalled forks by facilitating Cohesin loading (Delamarre et al., 2020). Although the flexibility of the RAD50 coiled-coil domain has prevented determination of its whole structure at atomic resolution (Käshammer et al., 2019; Park et al., 2017), several studies suggested that this domain participates in the regulation of MRN functions by propagating information from the Zn-hook domain to the globular domain (Hohl et al., 2011, 2015; Park et al., 2017). Analyses using crystallographic microscopy, cryo-electron microscopy (cryo-EM), and high-throughput single-molecule microscopy suggested that dimers of the ATP-bound MRE11-RAD50 intracomplex (M_2R_2) mostly adopt a ring conformation that can interact and scan the DNA homoduplex to recognize the DNA end and trigger ATM/Tel1-dependent DDR (Deshpande et al., 2014; Hopfner, 2014; Käshammer et al., 2019; Myler et al., 2017; Tatebe et al., 2020). A model suggested that upon ATP and DNA binding, the MRE11-RAD50 intracomplex undergoes a conformational switch, leading to the interaction of intermolecular coiled-coil domains and resulting in a rod-shaped structure. This structural modification would allow exposure of the catalytic domain of MRE11 to the DNA end and stimulate nuclease activity and DNA end processing (Deshpande et al., 2014; Hopfner, 2014; Käshammer et al., 2019; Lammens et al., 2011; Lim et al., 2011; Liu et al., 2016; Rojowska et al., 2014). Several studies conducted in yeast and bacteria suggested that the RAD50 coiled-coil domain was particularly important during these conformational transitions by propagating spatial information from the Zn hook to the globular domain (Hohl et al., 2011, 2015; Hopfner et al., 2002; Käshammer et al., 2019; Lee et al., 2013; Park et al., 2017). Nonetheless, despite progress in structure determination of all or part of the MRN complex, our knowledge of the RAD50 coiled-coil functional role in the regulation of the multiple MRE11 complex functions remains limited, especially in mammals (Paull, 2018).

Here, we identified an individual, P1, who presented with immunodeficiency and developmental defects and has compound heterozygous mutations in *RAD50*. One of the mutations creates a null allele, and the other appears to be hypomorphic because of the loss of a single amino acid residue in the coiled-coil domain of RAD50 (denoted as RAD50^{E1035Δ}). The analysis of the human RAD50^{E1035Δ} mutant, as well as its yeast counterpart, provided unprecedented information, emphasizing the fundamental role of the RAD50 coiled-coil domain in modulating MRE11 complex functions. Furthermore, this study reports the first RAD50 separation-of-function mutation that does not affect ATM-dependent DDR but severely impairs DSB repair. These findings demonstrate the crucial role of the RAD50 coiled-coil domain to regulate MRE11-dependent DNA end resection and repair in humans.

RESULTS

Clinical Features of Individual P1

This study was initiated by the analysis of individual P1, who was diagnosed at 7 years of age with bone marrow failure and developmental defects. In the family, the two other children and parents were healthy (Figure 1A). P1's cell blood count revealed thrombocytopenia (platelet count of 113 G/L) associated with anemia (hemoglobin level of 10 g/dL) and neutropenia (neutrophil count of 1 G/L) (Table S1). Bone marrow smears and biopsies showed reduced cellularity (15%) without myelodysplastic features, consistent with aplastic anemia. Immunophenotyping highlighted a virtual absence of circulating B lymphocytes (CD19⁺), whereas T lymphocytes (CD3⁺) that were normal in number exhibited an increased proportion of central memory T cells (CD3⁺ CCR7⁻ CD45A⁻) (Table S1). Conversely, the proportions of both naive CD4⁺ T cells (evaluated by the CD45RA marker) and recent thymus emigrant (characterized by CD45RA⁺CD31⁺ markers) were markedly reduced, suggesting impaired T lymphopoiesis (Table S1). Moreover, physical examination of P1 revealed failure to thrive (height of 108.5 cm, <3rd percentile; weight of 17.2 kg, <3rd percentile), skin pigmentation, nail dysplasia, leukoplakia, dental loss, microcephaly (cranial perimeter of 48 cm, <3rd percentile), and dysmorphism. P1 also developed a cataract at 10 years of age that necessitated surgical intervention. Collectively, P1's clinical features were reminiscent of a defect in DNA repair and/or telomere maintenance (Glousker et al., 2015; Rivera-Munoz et al., 2007). However, telomere restriction fragment (TRF) analysis indicated that telomere length in P1's peripheral blood cells was not reduced compared with his parents and his healthy sister (Figure S1).

Individual P1 Carries Biallelic *RAD50* Mutations

To determine the molecular etiology of the disease, we performed whole-exome sequencing analysis in P1 by considering coding sequences carrying rare biallelic variants (frequency less than 0.1% in 1,000 genomes, Exome Variant Server (EVS), Single Nucleotide Polymorphism Database (dbSNP), and our in-house database of 8,319 individuals) predicted to be deleterious (Figure 1A). This approach highlighted two mutations in *RAD50* that were confirmed by Sanger sequencing and present in a compound heterozygous configuration (Figure 1B). One consisted in a nucleotide insertion, leading to a frameshift and a premature stop codon (c.2165dup; p.Glu723Glyfs*5) (Figures 1B and 1C), inherited from the asymptomatic mother and present in the healthy sister and brother (Figure S2A). The other mutation was an in-frame deletion of three nucleotides, resulting in the loss of a single glutamic-acid residue at position 1035 (c.3109_3111del; p.Glu1035del) located in the coiled-coil domain of RAD50 (Figures 1B and 1C; Figure S2A). This deletion corresponded to a *de novo* mutation, because it was absent for the siblings and parents (Figure S2A), whereas microsatellite analysis ascertained for the genetic paternity of P1's father (Figure S2B). Both *RAD50* mutations were absent from the gnomAD database (>120,000 individuals tested). Sequencing of *RAD50* cDNA from P1's blood cells did not detect the c.2165dup; p.Glu723Glyfs*5 mutation, likely because of nonsense-mediated decay (NMD) (data not shown). Hence, the only *RAD50*

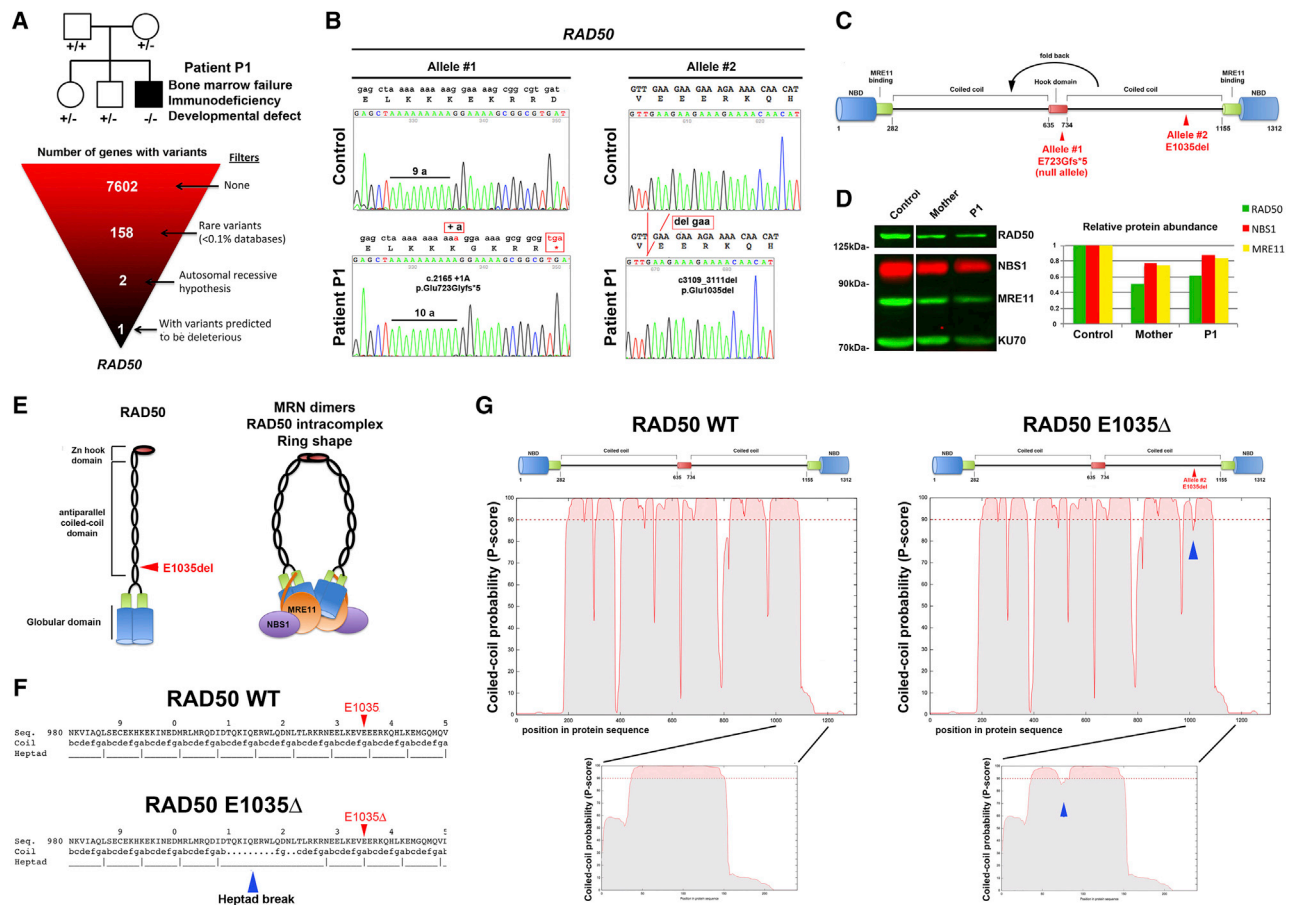


Figure 1. Biallelic RAD50 Mutations Identified in Individual P1

(A) (Upper panel) Pedigree of P1's family. (Lower panel) Genetic approach used to identify the disease-causing gene. (B) Sequencing of cloned RAD50 PCR products in the patient. (C) Schematic of the domain architecture of human RAD50, showing the position of disease-associated mutations. NBD, nucleotide binding domain. (D) (Left) Immunoblot of indicated proteins in B-LCL lysates from a healthy donor, P1, and his mother. KU70 was used as loading control. (Right) Relative abundance of indicated proteins normalized to KU70. (E) (Left) Schematic view of a RAD50 protein. (Right) Schematic view of the MRN complex in its intracomplex conformation¹³. (F) Marcoil analysis revealed a break in the heptad repeats near the E1035Δ mutation (blue arrow). (G) (Upper panels) Representative view of the coiled-coil probability along the full WT and RAD50^{E1035Δ} sequences determined by the Marcoil tool. The red area corresponds to the probable coiled-coil regions. (Lower panels) Zoom of the region encompassing the E1035Δ mutation. The blue arrow indicates a break in the coiled-coil probability.

transcripts present in P1's cells encoded a RAD50 protein lacking a unique glutamic-acid residue in the coiled-coil domain of RAD50 (p.Glu1035del, hereafter dubbed RAD50^{E1035Δ}) (Figure 1C). RAD50 immunoblots with B lymphoblastoid cell line (B-LCL) lysates from P1 and his mother revealed approximately half of the RAD50 amount compared with B-LCL lysate from a healthy donor (Figure 1D). This result was consistent with the presence of a null allele in both P1 and his mother (i.e., c.2165dup; p.Glu723Glyfs*5). Moreover, this finding indicated that RAD50^{E1035Δ} was correctly expressed and as stable as its wild-type (WT) counterpart. Congruent with an interdependent stability of the human MRN components (Stewart et al., 1999; Waltes et al., 2009), we noticed a reduced amount of NBS1 and MRE11 in cell lysates from P1 and his mother (Figure 1D). The RAD50^{E1035Δ} mutation was located in the coiled-coil struc-

ture composed of heptad amino acid repeats commonly labeled abcdefg, where a and d represent hydrophobic positions (Truebestein and Leonard, 2016) (Figure 1E). The program Marcoil, which calculates coiled-coil probability (Delorenzi and Speed, 2002), indicated that the loss of the residue E1035 led to a break in the heptad repeats (blue arrow in Figure 1F) that was predicted to disrupt the RAD50 coiled-coil structure near the mutation, as inferred by the drop in coiled-coil probability in this region (blue arrow in Figure 1G). Thus, we decided to investigate the functional consequence of this peculiar mutation in P1's cells.

RAD50^{E1035Δ} Mutation Impairs DNA Repair

First, we assessed whether P1's cells were able to cope with various DNA lesions produced by distinct genotoxic agents. P1's SV40-transformed fibroblasts, similar to cells from an

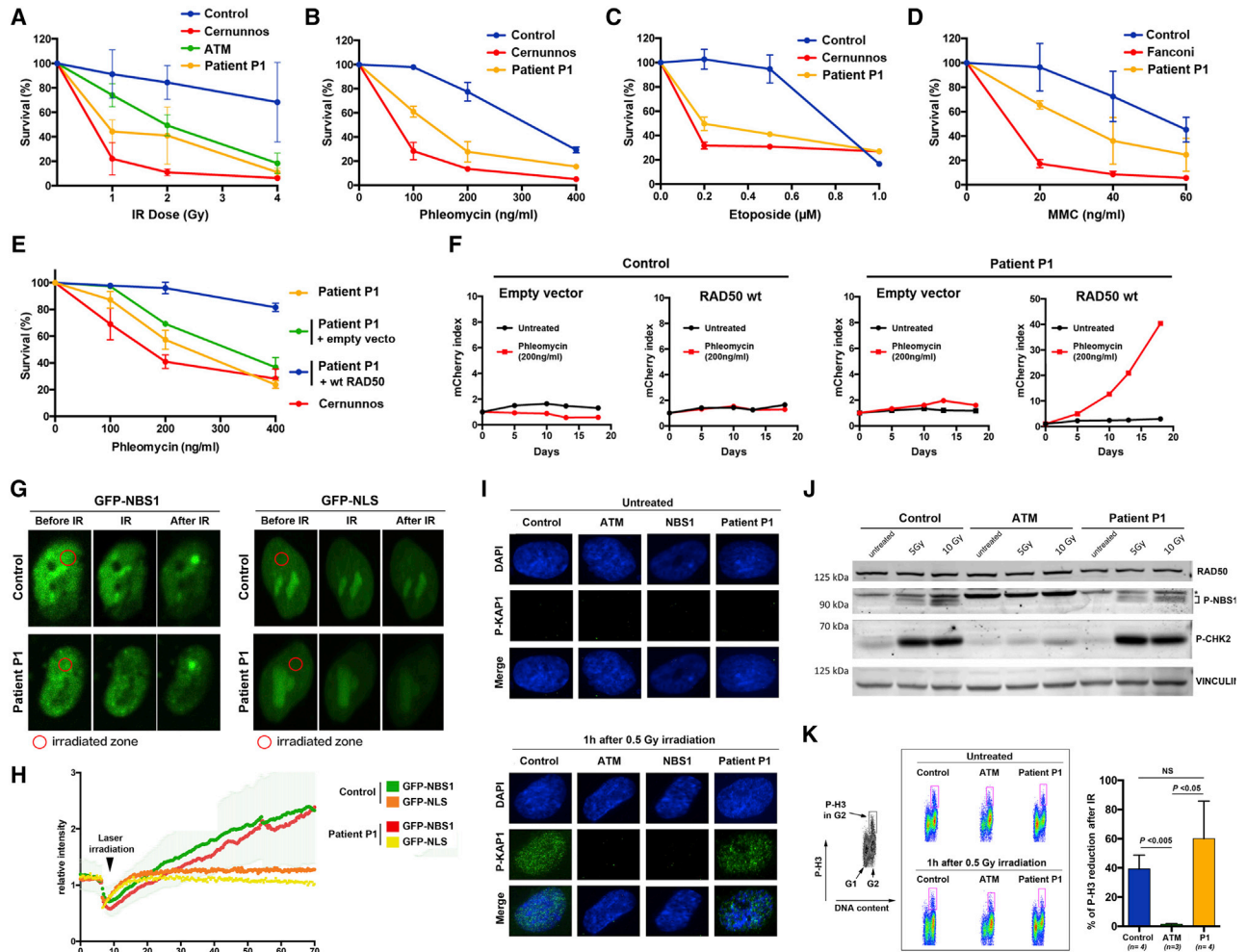


Figure 2. Defective DNA Repair but Normal DNA Damage Sensing and Signaling in P1's Cells

(A–D) Survival of SV40 fibroblasts after IR (A), phleomycin (B), etoposide (C) and MMC (D) treatment. Results are expressed as the fraction of surviving cells in relation to untreated cells. Each point represents the mean value and standard deviation of three separate determinations. ATM- and Cernunnos-deficient cells were used as sensitive controls. Control-sensitive fibroblasts were from ATM-, Cernunnos-, and Fanconi-deficient patients.

(E) Sensitivity of P1's cells to phleomycin after WT-RAD50 or empty vector transduction. This experiment was performed three times. Control-sensitive fibroblasts were from a Cernunnos-deficient patient.

(F) Functional complementation of phleomycin sensitivity provided by WT-RAD50 transduced into the patient's cells compared with the empty vector. The selective growth advantage is scored as the increase in the index of mCherry-positive cells/mCherry-negative cells at various times compared with the initiation of the culture (index = 1). This experiment was performed twice.

(G) Recruitment of GFP-NBS1 to DNA damage upon laser microirradiation in indicated cells. GFP-NLS (nuclear localization signal) is used as negative control. Irradiated zones are located in the red circles. Representative of three independent experiments.

(H) Kinetics of recruitment of GFP-NBS1 and GFP-NLS to DNA damage in the control and the patient's cells.

(I) Immunofluorescence detection of P-KAP1 in primary fibroblasts before and 1 h after 0.5 Gy irradiation. ATM- and NBS1-deficient cells are used as negative controls. The image is representative of three independent experiments.

(J) Phosphorylated forms of CHK2 and NBS1 detected by western blot analysis of whole-cell lysates from SV40 fibroblasts from a healthy control, an ATM-deficient patient, and P1 untreated or 1 h after 5 or 10 Gy irradiation. Vinculin immunoblot is used as loading control. An asterisk indicates a nonspecific band.

(K) (Left) DNA content and histone H3 phosphorylation (P-H3) in G2 (pink rectangle) were analyzed by fluorescence-activated cell sorting (FACS). (Middle) FACS images of P-H3 in G2 in untreated and irradiated cells. (Right) G2/M checkpoint measured by the percentage of inhibition of entry into mitosis in cells after IR. Results represent the mean and SD from at least three independent experiments. Statistical significances are noted.

ATM-deficient patient, exhibited a strong sensitivity to ionizing radiation (IR), suggesting a DNA repair defect (Figure 2A). P1's cells also had a pronounced sensitivity to the DSB-inducing agent phleomycin (Figure 2B) and to etoposide (Figure 2C), a

drug that generates topoisomerase 2-DNA adducts. P1's cells were also sensitive to the DNA interstrand-crosslink (ICL)-inducing agent mitomycin C (MMC), although to a lesser extent than cells from a Fanconi anemia patient (Figure 2D) and

not associated with an impaired MMC-induced FANCD2 ubiquitination (data not shown). Of note, a human HT1080 cell line carrying a nonsense mutation on one allele of the *RAD50* gene (*RAD50*^{+/-}) generated by CRISPR-Cas9 only exhibited modest sensitivity to genotoxics at higher doses, ruling out haploinsufficiency as the cause of the severe DNA repair defect in P1's cells (Figure S3). Altogether, these results demonstrated that P1's cells have a general DNA repair defect that is likely the cause of the bone marrow failure and developmental anomalies found in this patient.

To verify that the *RAD50* deficiency in P1's cells was responsible for the DNA repair defect, we transduced the cells with a vector expressing WT-*RAD50* (Figure S4). Although the empty vector had no effect, the WT-*RAD50*-expressing vector complemented the pleomycin sensitivity of P1's cells (Figure 2E). We confirmed this result using a multicolor competition assay after transduction of P1 and control cells with a lentiviral Ires-mCherry vector containing, or not containing, the WT-*RAD50* coding sequence (Smogorzewska et al., 2007). A mix of transduced (mCherry⁺) and nontransduced (mCherry⁻) cells was analyzed for selective advantage in culture, as evaluated by the mCherry index of transduced (mCherry⁺) over nontransduced (mCherry⁻) cells upon treatment with pleomycin (Figure 2F). Ectopic expression of mCherry/WT-*RAD50*, but not mCherry alone, gave in P1's cells a strong selective advantage over nontransduced cells upon treatment with pleomycin, as determined by the 40-fold increase in mCherry/WT-*RAD50*-expressing cells after 18 days in this culture condition (Figure 2F). Altogether, these results established a causal link between the DNA repair defect and the expression of *RAD50*^{E1035Δ} in P1's cells.

***RAD50*^{E1035Δ} Mutation Does Not Affect DNA Damage Sensing and Signaling**

To determine whether the DNA repair defect in P1's cells could be associated with impaired MRN recruitment at DNA damage sites, we monitored the dynamics of NBS1 at DSBs. We transfected cells with a vector expressing green fluorescent protein (GFP)-NBS1 fusion protein and analyzed by live microscopy GFP-NBS1 behavior following the generation of localized DNA damage induced by a laser microbeam (Zhang et al., 2016). Kinetics and intensity of GFP-NBS1 recruitment at DNA lesions was similar in control and P1's cells (Figures 2G and 2H), indicating that *RAD50*^{E1035Δ} did not affect the capacity of the MRN complex to sense the DNA lesion and accumulate at DNA DSBs.

We next assessed whether the DNA repair defect in P1's cells was associated with impaired ATM-dependent DDR functions (Stracker and Petrini, 2011). As expected, KAP1 phosphorylation (P-KAP1), analyzed by immunofluorescence, was undetectable in primary fibroblasts from ATM- and NBS1-mutated patients, demonstrating the need for functional ATM and MRN in this process (Figure 2I). To our surprise, IR-induced P-KAP1 was readily detected in primary fibroblasts from P1, suggesting that *RAD50*^{E1035Δ} did not impair ATM-dependent P-KAP1. Furthermore, western blot analysis demonstrated that P1's SV40 fibroblasts normally induced phosphorylation of NBS1 and CHK2 following IR, whereas ATM-deficient control cells did not (Figure 2J). Consistent with normal IR-induced CHK2 phosphorylation, P1's SV40-transformed fibroblasts exhibited a functional

G2/M checkpoint, as determined by the reduction of phosphohistone 3 in the G2 phase, a marker of chromosome condensation, following IR (Figure 2K). As expected, ATM-deficient cells used as negative control had a defective G2/M checkpoint (Figure 2K).

Collectively, these results demonstrated that P1's cells behaved differently from ATM- and NBS1-mutated cells and provided evidence that the human *RAD50*^{E1035Δ} mutation, despite leading to a DNA repair defect, did not impair recruitment of the MRN complex at DNA damage sites or the subsequent activation of ATM.

***RAD50*^{E1035Δ} Mutation Impairs DNA End Resection and HDR**

MRE11 initiates double-strand DNA end resection via its nuclease activity, a process that culminates in the formation of ssDNA that is used to scan sequence homology and promote HDR (Stracker and Petrini, 2011; Syed and Tainer, 2018). During this process the ssDNA molecules are coated by replication protein A (RPA) and then by RAD51 (Zhao et al., 2019). To gain insight into the DNA repair pathway that might be affected in this patient, we assessed DNA end resection following IR treatment in P1's cells. In contrast to P-KAP1, which was readily detected in P1's primary fibroblasts 6 h after IR (Figure 3A), RPA foci (Figure 3B) and RAD51 foci (Figure 3C; Figure S5) ($p < 0.0001$) were virtually absent from these cells, suggesting impaired DNA end resection at the IR-induced DSB. The impaired RAD51 foci formation upon IR treatment was confirmed in SV40-hTERT P1's fibroblasts ($p < 0.0001$) (Figure 3D). Transduction with WT-*RAD50*, but not with an empty vector, complemented the impaired IR-induced RAD51 foci formation in P1's cells, a result demonstrating the causal link between compromised DNA end resection and *RAD50* deficiency in these cells (Figure 3D). We next tested the HDR pathway by measuring the efficiency of insertion in a chromosomal context of a DNA sequence encoding Clover, a GFP variant, mediated by CRISPR-Cas9-mediated HDR within the first exon of the Lamin-A (LMNA) gene (Figure S6A) (Pinder et al., 2015). Cells were transfected with an mCherry-expressing vector to gate on transfected cells (mCherry⁺), in combination with the Clover-donor vector with or without CRISPR-Cas9 vector targeting the Lamin-A locus (Pinder et al., 2015). This approach induced a significant increase in Clover-positive cells in control cells transfected with both the donor and the CRISPR-Cas9 vectors ($p < 0.0001$), asserting efficient HDR in these cells (Figure 3E). In contrast, in the same experimental conditions, we did not detect a significant increase in Clover expression in P1's cells, suggesting that HDR was impaired in these cells (Figure 3E). Because the HDR pathway is mainly active during the S and G2 phases, when a DNA template generated by DNA replication is available (Jasin and Rothstein, 2013), we analyzed the cell-cycle profile of P1's cells. As determined by the combined detection of bromodeoxyuridine (BrdU) incorporation and propidium iodide staining, the cell-cycle profiles in control and P1's cells were similar, ruling out that the defective HDR in P1's cells was caused by an abnormal cell cycle (Figure S6B).

We concluded from these experiments that the DNA repair defect observed in P1's cells was associated with a reduced resection of IR-induced DSBs and impaired HDR efficiency.

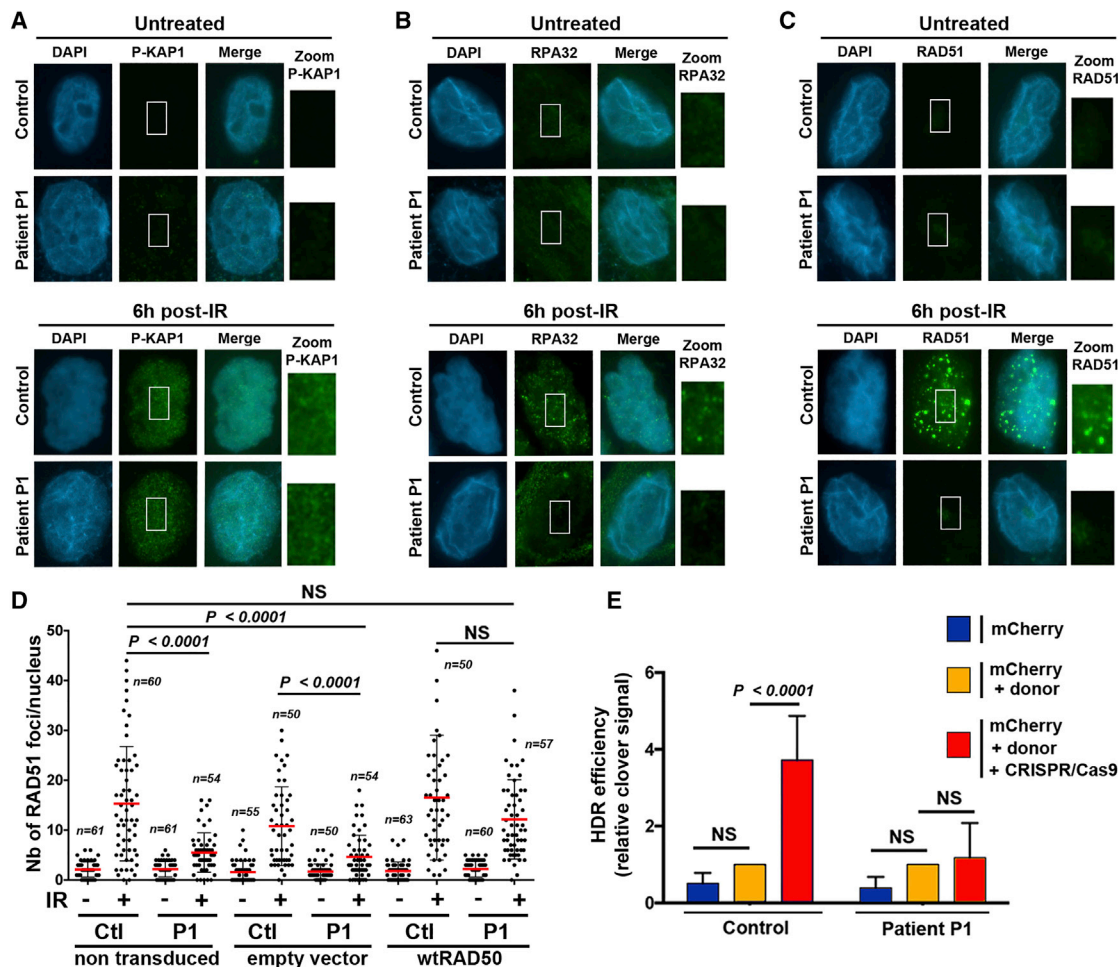


Figure 3. P1's Cells Exhibit a Reduced DNA End Resection and HDR

(A–C) Immunofluorescence detection of P-KAP1 (A), RPA32 (B), and RAD51 (C) in primary fibroblasts from healthy control and P1 before and 6 h after 10 Gy irradiation. The image is representative of three independent experiments.

(D) Quantitative analysis of RAD51 foci before and after IR in SV40-hTERT fibroblasts untransduced or transduced with an empty or WT-RAD50-expressing vector. The number of nuclei scored and statistical significances are noted.

(E) Efficiency of HDR assessed by the Cas9-directed knockin of Clover in the Lamin-A (LMNA) coding sequence. Cells were transfected with the mCherry vector alone (used to control transfection efficiency) or in combination with the repair template sequence containing the Clover coding sequence in conjunction, or not, with the pX330-LMNA1 vector encoding Cas9 and the guide RNAs (gRNAs) targeting the LMNA sequence (denoted as CRISPR-Cas9). Relative HDR efficiency was measured by the percentage of Clover⁺ cells triple transfected relative to cells transfected without the CRISPR-Cas9-gRNA-expressing vector. Results represent the mean and SD of triplicates from three independent experiments.

RAD50^{E1035Δ} Mutation Prevents Nascent DNA Degradation after Replication Stress

In the absence of genotoxic stress, spontaneous 53BP1 focus formation is an indicator of replicative stress (Pasero and Vindigni, 2017). We noticed an increase in 53BP1 foci in P1's primary fibroblasts in the absence of exogenous stress (Figure 4A). Automated detection and quantification of 53BP1 foci reported a mean of 7 events/nucleus in P1's cells (n = 9,894) and 2.7 events/nucleus in control cells (n = 19,632; p < 0.0001) (Figure 4B), with 63.9% of P1's cells exhibiting 5 or more 53BP1 foci versus 16.3% in control cells (p < 0.0001) (Figure 4C). We then performed a replication-combing assay (RCA), a technique that enables the measurement of fork speed, fork asymmetry, and

interorigin distance (Bianco et al., 2012; Schurra and Bensimon, 2009) (Figure 4D). SV40-transformed fibroblasts from P1 consistently exhibited defective DNA replication inferred by a significant reduction of fork speed (p < 0.0001) (Figure 4E). We also noticed a shortening of interorigin distance in P1's cells (p < 0.01) (Figure 4F), suggesting increased dormant origin firing to compensate for reduced fork speed, as previously described (Anglana et al., 2003; Courbet et al., 2008; Mokrani-Benhelli et al., 2013). P1's cells also showed an increase in asymmetric replicons (p < 0.001), likely attributable to stochastic replication fork stalling and/or collapse (Figure 4G). Transduction of P1's cells with a lentiviral vector allowing the expression of WT-RAD50 restored a fork speed comparable to that of the control

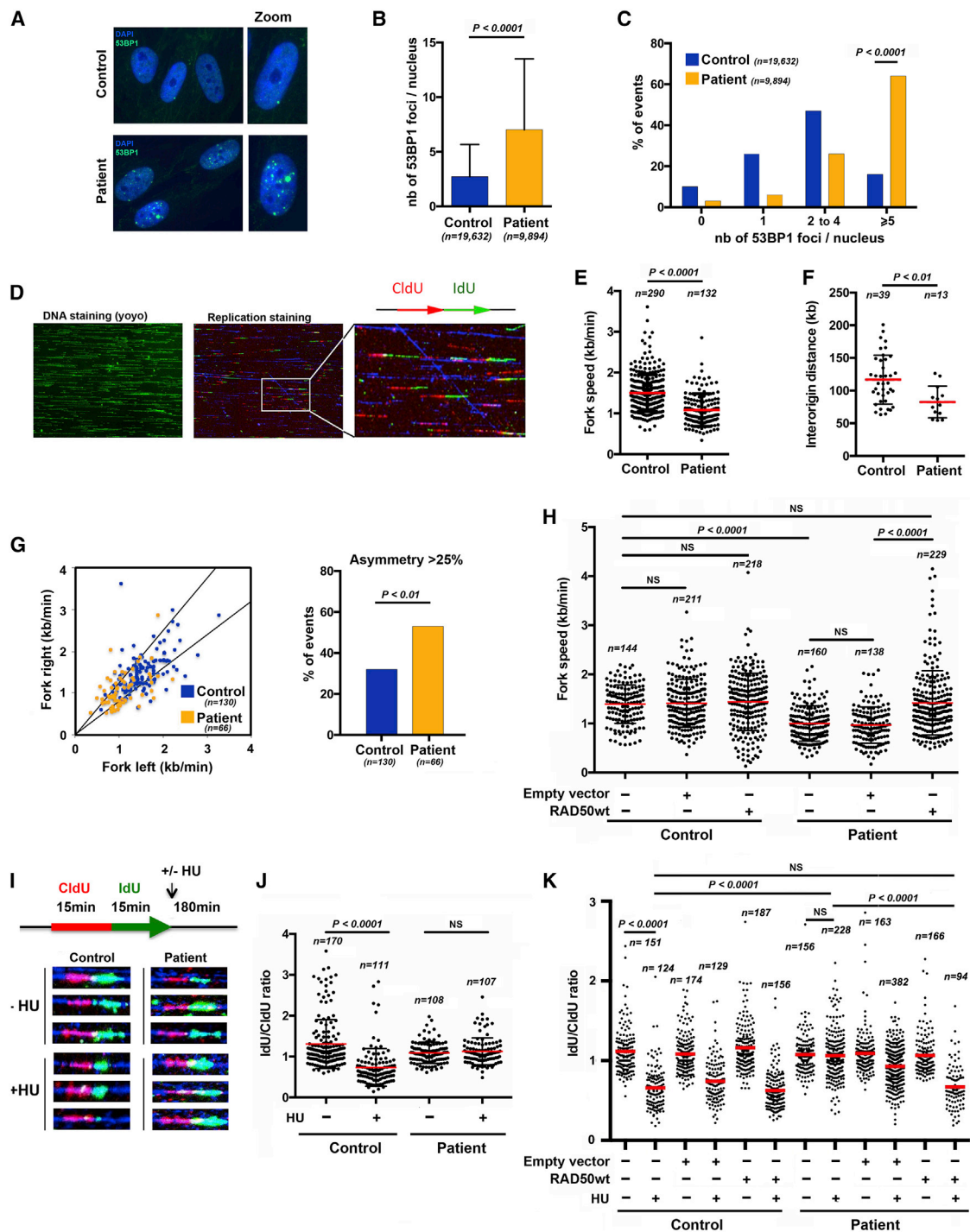


Figure 4. DNA Replication and Resection at Stalled Forks in P1's Cells

(A) Detection of 53BP1 foci in primary fibroblasts from the patient and a healthy control at a similar passage.

(B) Mean of 53BP1 foci in primary fibroblasts from a healthy control and the patient. The number of nuclei scored and statistical significances are noted.

(C) Percentages of fibroblasts from a control and P1 with the indicated number of 53BP1 foci are indicated. Statistical significances are noted.

(D) (Up) Representative image of combed DNA (yoyo labeling). (Down) Picture representing the detection of newly synthesized DNA by molecular combing (successive pulse labels of IdU and CldU). DNA is detected by counterstaining (blue).

(E) Fork velocity in SV40 fibroblasts from 3 independent experiments in control and P1 are represented.

(F) Interorigin distances in SV40 fibroblasts from control and P1 are represented. The statistical significances are noted.

(legend continued on next page)

cells, demonstrating a causal link between replication defects and RAD50 deficiency in P1's cells (Figure 4H).

Fork restart depends on fork resection initiated by the nuclease activity of MRE11 that degrades newly synthesized DNA strands (Bryant et al., 2009; Pasero and Vindigni, 2017; Trenz et al., 2006). To test whether replicative stress observed in P1's cells could be accompanied by a defect in DNA resection at arrested forks, after successive pulses of 5-Chloro-2'-deoxyuridine (CldU) and 5-Iodo-2'-deoxyuridine (IdU), we treated cells with a high dose of hydroxyurea (HU) for 3 h to provoke replicative stress and examined DNA resection by molecular combing (Coquel et al., 2019) (Figure 4I). As expected, HU treatment led to nascent DNA degradation in control cells, as revealed by a IdU/CldU ratio < 1 (Figures 4I and 4J). In contrast, IdU track length did not change after HU treatment in P1's cells (Figures 4I and 4J), suggesting that RAD50^{E1035Δ} mutation led to impaired DNA resection at arrested forks. Transduction of WT-RAD50 in P1's cells complemented this defect (Figure 4K), supporting the notion that RAD50^{E1035Δ} impaired DNA resection at arrested forks.

Collectively, the sharp reduction of DNA end resection at IR-induced DSBs (Figures 3B–3D; Figure S5) and at arrested forks (Figure 4J) observed in P1's cells suggested that the RAD50^{E1035Δ} mutation impairs MRE11 nuclease activity.

Impairment of Nuclease Activity of a Recombinant MR(N) Complex Containing RAD50^{E1035Δ}

Because complete loss of MRE11 nuclease activity is incompatible with cellular viability (Buis et al., 2008; Hoa et al., 2015, 2016), we surmised that RAD50^{E1035Δ} could not abolish this process. To directly evaluate the impact of RAD50^{E1035Δ} on MRE11 nuclease activity, we expressed and purified human MRE11 and RAD50 (MR) as a complex from baculovirus-infected *Spodoptera frugiperda* 9 (Sf9) cells as previously described (Anand et al., 2016) (Figure S7A). For simplicity, we denominated the wild-type MRE11-RAD50 complex as MR WT and the MRE11-RAD50 complex containing RAD50^{E1035Δ} as MR E1035Δ. As depicted in Figure 5A, MR WT and MR E1035Δ were similarly purified, reinforcing our previous results showing that the RAD50^{E1035Δ} mutation did not affect protein stability (Figures 1D and 2J; Figure S4A). Electrophoretic mobility shift assay (EMSA) using a 70-bp probe revealed a slight decrease in the DNA binding capacity of the MR E1035Δ complex compared with its WT counterpart (Figures 5B and 5C). *In vitro* assay with 50-bp unprotected DNA substrates revealed a consistent decreased exonuclease activity of MR complexes with MR E1035Δ compared

with MR WT (Figures 5D and 5E). In particular, the lower products corresponding to the most resected DNA substrates were sharply underrepresented with MR E1035Δ, asserting reduced exonuclease activity (Figures 5D and 5F). CtBP-interacting protein (CtIP) is a cofactor that potentiates the DNA binding activity of the MR complex, especially in its nonphosphorylated form (Anand et al., 2016). We produced recombinant CtIP treated or not treated with lambda phosphatase to generate either nonphosphorylated CtIP or phosphorylated CtIP (pCtIP), respectively (Figure S7B). As previously described (Anand et al., 2016), adding the nonphosphorylated recombinant CtIP led to a strong increase in the DNA binding capacity of the MR complex that, in this condition, was similar with MR E1035Δ and MR WT (Figures S7C and S7D). This result indicated that in the presence of nonphosphorylated CtIP, the RAD50 E1035Δ mutation did not impair the DNA binding capacity of the MR complex. However, in the presence of pCtIP, we observed a slight reduction in DNA binding capacity of the mutated MR E1035Δ complex (Figures S7C and S7D). Next, we added MBP-NBS1 and pCtIP to the complex to assess the endonuclease activity of MRE11, as described previously (Anand et al., 2019). This analysis revealed a subtle reduction of endonuclease activity of the MR E1035Δ complex, evident only at a higher concentration (Figures 5G and 5H). Salt titration experiments performed to examine whether the effect of the mutant may be more apparent after more restrictive conditions confirmed the slightly decreased endonuclease activity of the MR E1035Δ complex and showed that a high salt concentration did not worsen this defect (Figures S7E and S7F). The detection of MRE11 endonuclease activity, which depends on ATP hydrolysis (Anand et al., 2016; Cannavo et al., 2019; Deshpande et al., 2017; Hopfner et al., 2000; Liu et al., 2016; Paull and Gellert, 1999), suggested that recombinant RAD50^{E1035Δ} did not abolish ATP hydrolysis, at least *in vitro*. Accordingly, *in vitro* ATPase activity was similar with MR E1035Δ and MR WT (Figures 5I and 5J).

In summary, our experiments using recombinant proteins indicated that the RAD50^{E1035Δ}-containing MRN complex exhibits defects in MRE11 nuclease activity *in vitro*, a result congruent with the conclusions drawn from the observations obtained in P1's RAD50^{E1035Δ}-expressing cells.

Modeling the Human RAD50^{E1035Δ} Mutation in *Saccharomyces cerevisiae*

We next modeled the human RAD50^{E1035Δ} mutation in *S. cerevisiae* by producing a yeast strain deleted of the corresponding residue, i.e., the glutamic acid at position 1042

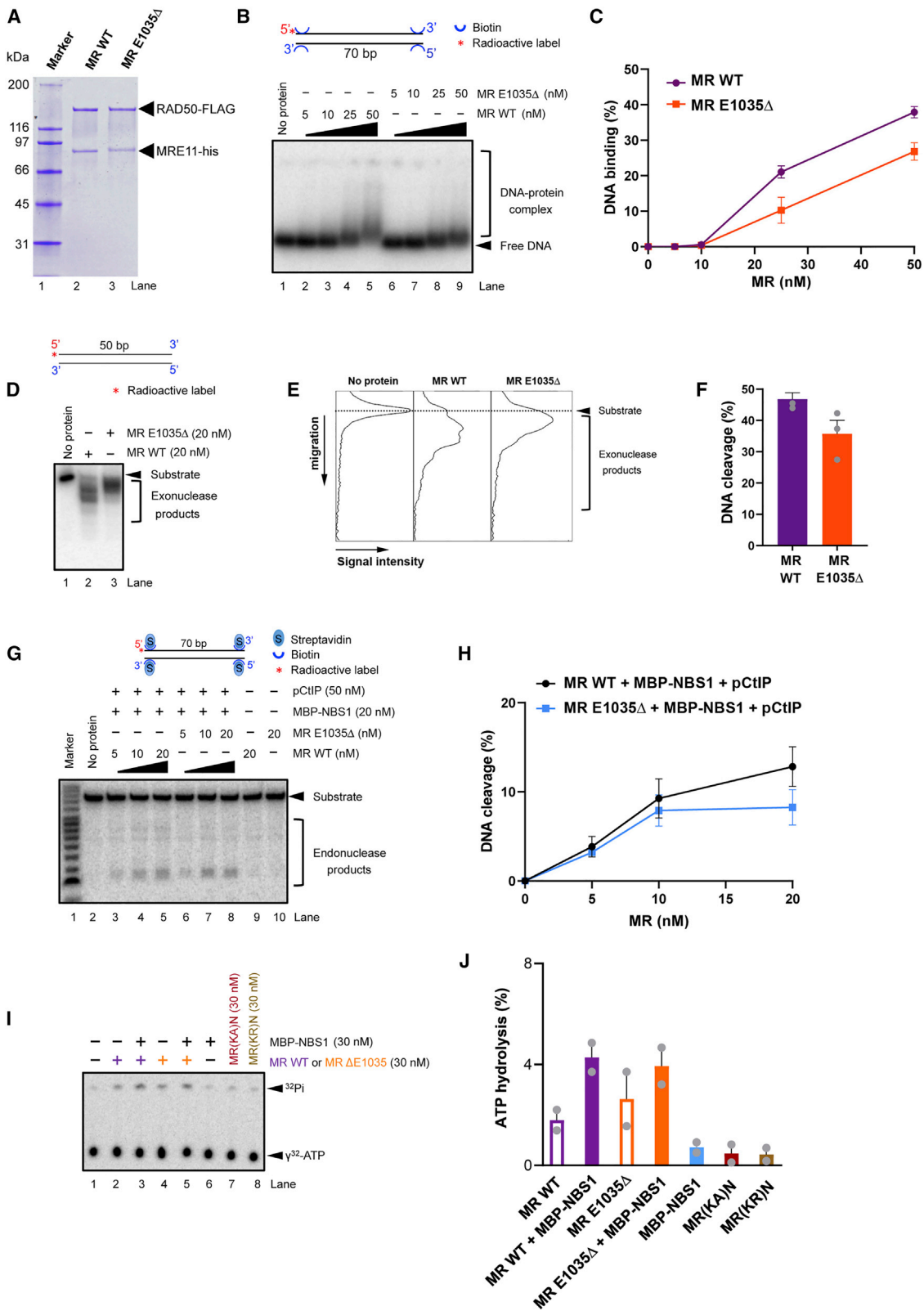
(G) (Left) Asymmetric replicon with sister forks with a more than 25% length difference in SV40 fibroblasts from control and P1. Plots of the distances covered by right-moving and left-moving sister forks during the IdU and CldU pulses from two independent experiments. (Right) Percentage of replicons with more than 25% asymmetry in SV40-transformed fibroblasts from control and P1. The statistical significance is noted.

(H) Fork velocity of SV40-transformed fibroblasts from control and P1 before or after transduction with a WT-RAD50-expressing vector or empty vector. Results are representative of two independent experiments. The statistical significances are noted (Mann-Whitney statistical test).

(I) (Upper panel) Protocol used to measure DNA resection after replicative stress induction by HU. (Lower panel) Representative tracks of CldU (red) and IdU (green) incorporation in control and patient's cells with or without HU treatment. DNA is counterstained in blue.

(J) DNA resection at stalled forks is determined by the ratio between CldU and IdU track lengths after 3 h of HU treatment. Results are representative of two independent experiments.

(K) DNA resection at stalled forks after 3 h of HU in control and P1 cells before or after transduction with an empty or WT-RAD50-expressing vector. Results are representative of two independent experiments. The statistical significances are noted (Mann-Whitney statistical test).



(legend on next page)

(*rad50-E1042Δ*) (Figure 6A). In addition, we generated a strain lacking a nearby glutamic acid at position 1044 (*rad50-E1044Δ*) (Figure 6A) and created two other yeast strains carrying missense mutations instead of deletion at position 1042, where the glutamic acid residue was substituted by either an alanine (*rad50-E1042A*) or a lysine (*rad50-E1042K*). Western blot and coimmunoprecipitation experiments showed normal expression and interaction with Mre11 of the deletion and missense mutants at both 30°C and 37°C, indicating that these mutations did not impair Mre11 complex formation and stability (Figure 6B). However, unlike the WT strain, *rad50-E1042Δ* and *rad50-E1044Δ* deletion mutants exhibited high sensitivity to camptothecin (CPT) (Figure 6C), methyl methane sulfonate (MMS) (Figure 6D), and HU (Figure 6E) at 37°C (but not at 30°C), indicating a strong temperature-sensitive effect of these mutations on DNA repair. In contrast, both *rad50-E1042A* and *rad50-E1042K* missense mutants showed WT levels of survival in the presence of CPT, MMS, and HU at both 30°C and 37°C (Figures 6C–6E). These observations provided evidence that the glutamic acid residue at position 1042 (or position 1044) in the coiled-coil domain of Rad50 is not critical for DNA repair. Instead, the presence of any residue at this position is required, presumably to preserve the phasing of the local heptad-repetitive disposition of the coiled-coil region. Consistent with this result, Marcoil analysis predicted that Rad50 deletion mutations caused a heptad break in the coiled-coil domain, whereas this structure was not affected in missense mutants (Figure S8A). Thus, this observation supported the hypothesis that the temperature-dependent DNA repair defect observed in *rad50-E1042Δ* and *rad50-E1044Δ* strains resulted from an abnormal coiled-coil conformation.

In *S. cerevisiae*, telomere maintenance relies on a functional Tel1^{ATM} pathway. Both *rad50-E1042Δ* and *rad50-E1044Δ* deletion mutants, but not *rad50-E1042A* and *rad50-E1042K* missense mutants, exhibited shorter telomeres at 37°C (and to a lesser extent at 30°C) than in the WT strain, suggesting impaired Tel1 activation in deletion mutants (Figure 6F; Figure S8B). We previously showed that MMS sensitivity of *mec1^{ATR}Δ* cells is strongly rescued by *sae2^{CUP}Δ*, because *mec1Δ sae2Δ* cells hyperactivate Tel1 kinase signaling and compensate for a lack of the Mec1 kinase (Park et al., 2017; Usui et al., 2001). Thus, to examine Tel1 function, we evaluated the phosphorylation of Rad53^{CHK2} and the survival upon MMS treatment of Rad50 mutants deficient for both Mec1 and Sae2.

Rad50-E1042Δ mec1Δ sae2Δ and *rad50-E1044Δ mec1Δ sae2Δ* mutant strains exhibited defective survival (Figure 6G) and Rad53 phosphorylation (Figure S8C) upon MMS exposure at 37°C, confirming impaired Tel1 signaling at this temperature. In contrast, *rad50-E1042A mec1Δ sae2Δ* and *rad50-E1042K mec1Δ sae2Δ* mutants behaved as WT at both 30°C and 37°C (Figure 6G; Figure S8C).

Altogether, the experiments conducted in yeast demonstrated that the loss of a unique residue breaking the heptad repeats in the coiled-coil domain of Rad50 did not affect Rad50 expression or Mre11 complex formation but severely affected DNA repair and Tel1 checkpoint signaling in a temperature-dependent manner.

DISCUSSION

In this study, we identified biallelic mutations in the RAD50-encoding gene in an individual (P1) exhibiting bone marrow failure, immunodeficiency, microcephaly, and developmental defects. Consistent with the function of RAD50 as a part of the MRN complex, most of P1's clinical characteristics were reminiscent of, although apparently less severe than, those found in the autosomal-recessive diseases Nijmegen breakage syndrome (NBS) and ataxia-telangiectasia-like disorder (ATLD), caused by biallelic mutations in the genes encoding NBS1 and MRE11, respectively (O'Driscoll, 2012; Stracker and Petrini, 2011). The symptoms observed in these disorders, as well as in P1, most likely originate from the genome instability and DNA damage accumulation that particularly affect proliferating tissues and lead to apoptotic attrition in those contexts (Taylor et al., 2019). P1 also developed a cataract at 10 years of age that necessitated surgical intervention. To our knowledge, cataracts have not been reported in patients with NBS1 and MRE11 deficiencies. However, a mouse model has implicated Nbs1 in terminal differentiation of the lens fiber cells and cataractogenesis (Yang et al., 2006). Thus, the early-onset cataract in P1 suggests that RAD50 might also participate in the development and maintenance of the lens in humans.

To our knowledge, RAD50 hypomorphism has only been reported twice in two individuals who presented with microcephaly, mental retardation, and short stature but no immunodeficiency (Taylor et al., 2019; Waltes et al., 2009). These patients carried biallelic RAD50 mutations that strongly reduced the expression of RAD50 (Ragamin et al., 2020; Waltes et al., 2009).

Figure 5. Impairment of Nuclease Activity of Recombinant MRE11 and RAD50^{E1035Δ} Proteins

- (A) Recombinant MRE11-RAD50 (MR) with WT RAD50 (MR WT) or mutated RAD50^{E1035Δ} (MR E1035Δ) used in this study.
 (B) Representative DNA binding analysis by electrophoretic mobility shift assay with recombinant MR WT and MR E1035Δ using 70-bp-long double-strand DNA (dsDNA) as a substrate.
 (C) Quantitation of experiments shown in (B). Error bars, SEM; n = 3.
 (D) Exonuclease activity of MR WT or MR E1035Δ using a 50-bp-long dsDNA substrate.
 (E) Plots of signals shown in (D) reveal a reduction of the most resected DNA substrate (higher migration) with MR E1035Δ compared with MR WT.
 (F) Quantitation of experiments shown in (C). Error bars, SEM; n = 3.
 (G) Representative nuclease assay with MR WT or MR E1035Δ in the presence of MBP-NBS1 and pCtIP on 5' end-labeled 70-bp dsDNA with all ends blocked with streptavidin.
 (H) Quantitation of experiments shown in (G). Error bars, SEM; n = 3.
 (I) ATP hydrolysis activity of MR WT or MR E1035Δ with or without MBP-NBS1. The MRN complexes containing the RAD50 K40A (denoted as MR(KA)N) and RAD50 K40R (denoted as MR(KR)N) mutants, defective in ATP binding and hydrolysis (Cannavo et al., 2019; Chen et al., 2005), were used as negative controls.
 (J) Quantitation of experiments shown in (I). n = 2.

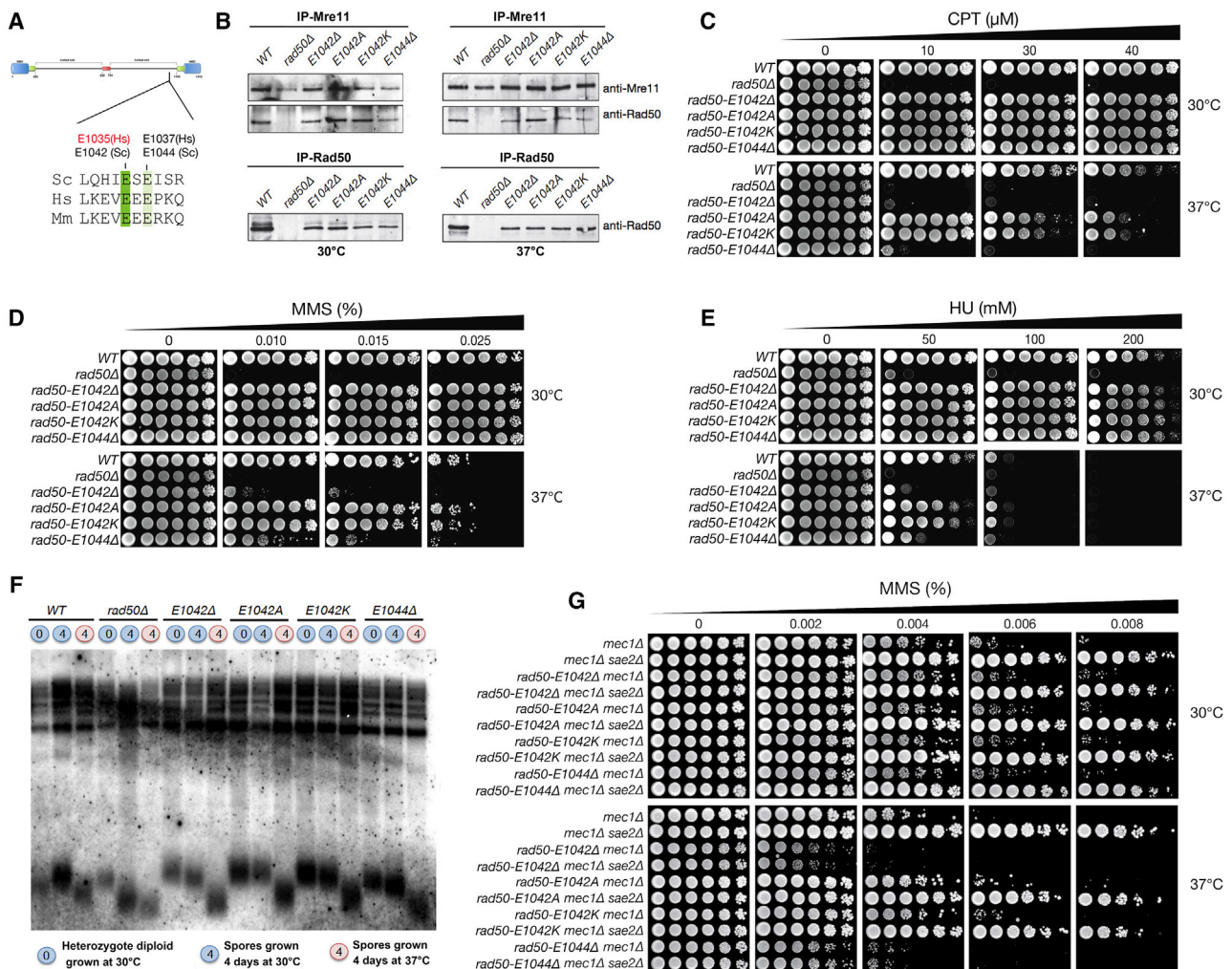


Figure 6. Modeling the Human RAD50^{E1035Δ} Mutation in *Saccharomyces cerevisiae*

(A) Schematic representation of the Rad50 structure and multiple sequence alignment of the C-terminal coil domain of Rad50 carrying the human E1035Δ mutation. The human E1035 residue and corresponding amino acid in *Saccharomyces cerevisiae* and *Mus musculus* are highlighted in green. (Sc, *S. cerevisiae*; Mm, *M. musculus*; Hs, *H. sapiens*).

(B) Coimmunoprecipitation and western blot with Rad50 or Mre11 antisera assessed the Mre11 complex integrity in WT and indicated Rad50 mutants. IP, immunoprecipitation.

(C–E) Sensitivities of WT and the indicated Rad50 mutant to the indicated concentration of CPT (C), MMS (D), and HU (E). Plates were incubated at 30°C and 37°C as indicated.

(F) Telomere lengths of WT and rad50 mutants after 4 days of growth at 30°C and 37°C. Heterozygote diploids were included as the zero generation of growth.

(G) Cell survival of rad50 mutants in Mec1- and Mec1-Sae2-deficient backgrounds upon MMS treatment at 30°C and 37°C.

Walters et al. (2009) and Ragamin et al. (2020) demonstrated that the highly pronounced reduction of functional MRN in the cells from these patients caused DNA repair defects, genome instability, and impaired ATM-dependent DDR similar to that observed in cells from patients with ATM, MRE11, and NBS1 mutations (Carney et al., 1998; Gatei et al., 2011; Shiloh and Lederman, 2017; Stewart et al., 1999; Taylor et al., 2019; Varon et al., 1998; Walters et al., 2009). In contrast, the present study showed that the cells from P1 exhibited severe defects in DNA replication, DNA repair, and DNA end resection, whereas the ATM-dependent DDR remained intact (Figure 7A). Because one of P1's RAD50 mutations generated a null allele, we attributed this unprece-

dent phenotype to the RAD50^{E1035Δ} mutation producing a normally expressed and stable RAD50 protein that lacks a unique glutamic acid, causing a break in the heptad repeats within the coiled-coil domain. Knowing that the complete loss of Rad50 is lethal in mice (Adelman et al., 2009) and having observed that P1's cells were proficient in ATM-dependent DDR, we deduced that the RAD50^{E1035Δ} mutation is hypomorphic.

P1's cells expressing RAD50^{E1035Δ} mirrored the phenotype observed in mouse embryonic fibroblasts (MEFs) expressing the Mre11 nuclease dead mutant (Mre11^{H129N}) (Buis et al., 2008). Indeed, in both Mre11^{H129N} MEFs and P1's RAD50^{E1035Δ} cells, MRN stability and recruitment to DSB, as well as ATM-

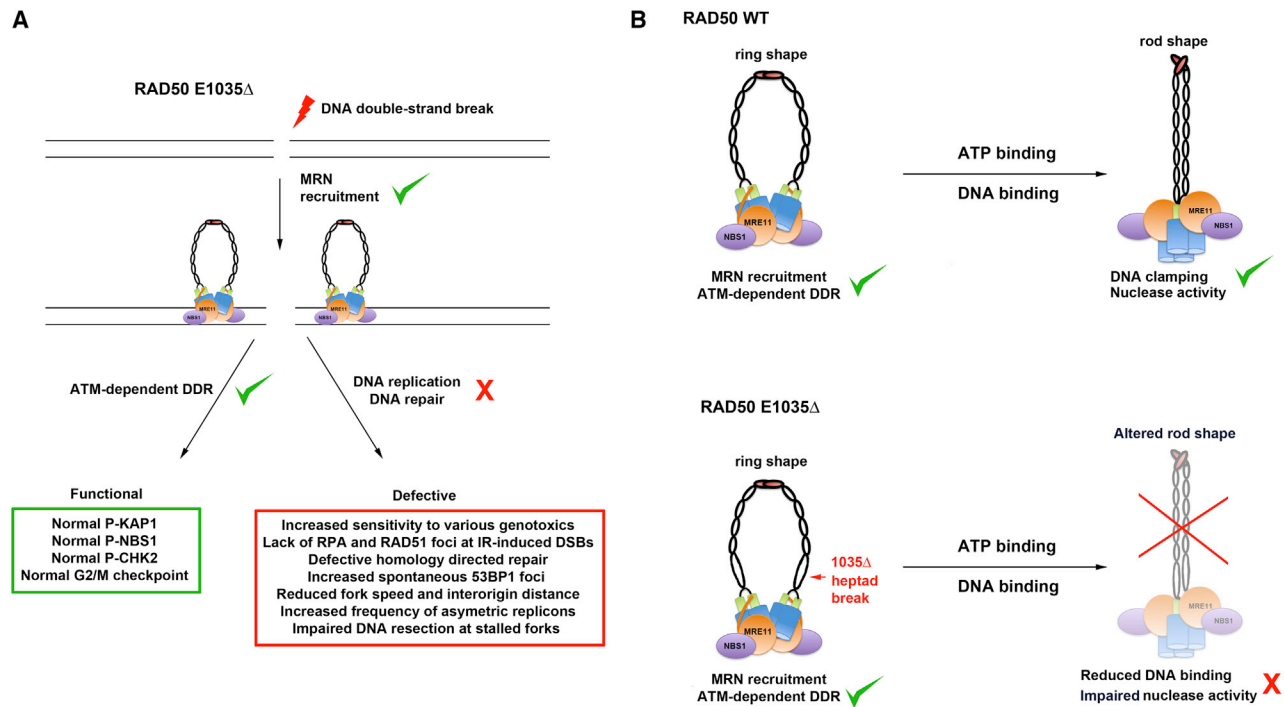


Figure 7. Speculative Model of the Functional and Structural Consequences of RAD50^{E1035Δ} in Human Cells

(A) Experimental findings conducted in P1's cells suggested that the MRE11-RAD50^{E1035Δ}-NBS1 (MR^{E1035Δ}N) complex is proficient in DNA DSB detection and ATM-dependent DDR activation. In contrast, MR^{E1035Δ}N was associated with DNA replicative stress, impaired resection at stalled forks and the IR-induced DNA end, a DNA repair defect, and defective HDR.

(B) Speculative model proposing that the ring-shaped MR^{E1035Δ}N intracomplex (open) is functional and can sense the DNA end and activate ATM-dependent DDR but that the RAD50^{E1035Δ} mutation provokes a hindrance in the structural transition from the ring toward the rod-shaped (closed) intracomplex conformation necessary to allow MRE11 access to its DNA substrate to promote nuclease activity.

dependent DDR, were functional (Buis et al., 2008). In contrast, both Mre11^{H129N} MEFs and P1's RAD50^{E1035Δ} cells exhibited increased sensitivity to genotoxics, defective IR-induced RPA and RAD51 focus formation, and reduced HDR efficiency (Buis et al., 2008; Myler et al., 2017). This resemblance is consistent with the interpretation that the RAD50^{E1035Δ} mutation affected the MRE11 nuclease activity *in vivo*. This hypothesis was supported by *in vitro* assays with purified recombinant proteins that showed impaired MRE11 exonuclease activity when in complex with RAD50^{E1035Δ}, whereas endonuclease activity was only slightly affected. However, because animal model expressing the Mre11 nuclease dead mutant at a homozygous status (Mre11^{H129N/H129N}) and human MRE11^{-/H129N} lymphoblast cell lines are unviable (Buis et al., 2008; Hoa et al., 2015, 2016), we surmise that RAD50^{E1035Δ} does not abolish MRE11 nuclease activity *in vivo* and/or that an alternative mechanism allows it to cope with defective MRE11-dependent DNA end resection in P1.

Hence, the RAD50^{E1035Δ} mutation represents the first human RAD50 separation-of-function mutation impairing DNA repair, DNA replication, and DNA end resection without affecting MRN recruitment to DSBs and ATM-dependent DDR (Figure 7A). It is unlikely that RAD50^{E1035Δ} affected RAD50-ATP binding and hydrolysis, because (1) this step is required for ATM-dependent DDR (Cannavo and Cejka, 2014; Deshpande et al., 2014; Lee

et al., 2013), (2) we observed an *in vitro* ATP hydrolysis with recombinant RAD50^{E1035Δ} (Figure 5), and (3) *in vitro* MRE11 endonuclease activity, which depends on ATP hydrolysis (Anand et al., 2016; Cannavo et al., 2019; Deshpande et al., 2017; Hopfner et al., 2000; Liu et al., 2016; Paull and Gellert, 1999), was detected with recombinant RAD50^{E1035Δ} (Figure 5). Instead, our observation that the recombinant MR^{E1035Δ} complex exhibited a reduced DNA binding and impaired exonuclease activity *in vitro* (Figure 5), combined with the reduction of IR-induced RPA and RAD51 foci and HDR in P1's cells (Figure 3), supports the notion that RAD50^{E1035Δ} impairs the MRN complex nuclease activity required to promote DNA end resection.

These results led us to propose a unified speculative model in which the human RAD50^{E1035Δ} mutation creates (or loses) a structural constraint in the coiled-coil domain that propagates to the globular domain to hinder the proper conformational transition of the MRN intracomplex from the ring to the rod shape (Figure 7B). This abnormally structured MRN intracomplex would retain its ATP binding and hydrolysis, as well as most of its capacity to stimulate MRE11 endonuclease activity. However, the mutant would corrupt the subsequent conformational change required for MRE11-dependent exonuclease activity and DNA end resection (Shibata et al., 2014). Because it has been suggested that the MRE11 intracomplex in its rod-shaped conformation clamps DNA (Kashammer et al., 2019), the observation

of a reduced capacity of recombinant MR E1035Δ proteins to interact with DNA *in vitro* supports this model. However, one cannot rule out that other functionally important coiled-coil interactions both within the antiparallel coiled coil and between the dimeric coiled-coil assemblies could be affected by RAD50^{E1035Δ}. Alternatively, we cannot exclude that the RAD50^{E1035Δ} mutation could compromise MRN to interact with and/or activate other factors, such as EXO1, DNA2, and EXD2, required for efficient DNA end resection *in vivo* (Broderick et al., 2016; Cejka et al., 2010; Delamarre et al., 2020; Myler et al., 2017; Pasero and Vindigni, 2017; Paull, 2018; Stracker and Petri, 2011; Syed and Tainer, 2018; Zhu et al., 2008).

Our analysis of the *rad50-E1042Δ* yeast strain modeling the human RAD50^{E1035Δ} mutation pinpointed a phenotype strikingly different from human cells. The *rad50-E1042Δ* strain (and *rad50-E1044Δ*) behaved as WT at 30°C, whereas it was almost as severe as the *rad50Δ* strain for both DNA repair and Tel1^{ATM} activation at 37°C. To our knowledge, this extremely severe thermosensitive phenotype in *rad50-E1042Δ* (and *rad50-E1044Δ*) is unprecedented in Rad50 mutants. Furthermore, the observation that yeast strains carrying missense mutations at position E1042 (*rad50-E1042A* and *rad50-E1042K*) behaved as WT at both 30°C and 37°C proved that the deletion of a single amino acid at this position is deleterious, not the nature of the residue. From these yeast experiments, we propose a model in which the *rad50-E1042Δ* (and *rad50-E1044Δ*) mutations, by breaking the heptad repeats, increase the flexibility of the coiled coil at 37°C, but not at 30°C. This temperature-dependent change would destabilize the coiled-coil interface-dependent dimerization, the conformation of the globular domain, the Zn-hook-mediated dimerization, or a combination of these modifications that would result in the extremely severe phenotype at 37°C. The phenotype of the *rad50-E1042Δ* strain at 37°C was similar to the one of the yeast mutant lacking the Zn hook, in which MR intra- and intercomplex formations are abolished (Hopfner et al., 2002; Stracker and Petri, 2011). Moreover, it has been recently reported that the Zn-hook-proximal coiled coil participated in the stabilization of the intracomplex Mre11 complex assembly (Park et al., 2017). One can therefore hypothesize that the temperature sensitivity of the *rad50-E1042Δ* mutant results from a defective MRN intracomplex assembly at 37°C (Hohl et al., 2011; Wiltzius et al., 2005). Interestingly, other yeast strains carrying mutations affecting the Rad50 Zn-hook and/or coiled-coil domains exhibited thermosensitive phenotypes (Hohl et al., 2011, 2015). However, the molecular cause of the temperature-dependent phenotype in these Rad50 mutants remains unclear, and future studies are warranted to research the structural and functional consequences of these mutants.

In summary, our study provided evidence that a single amino acid deletion that breaks the heptad repeats in the coiled-coil domain of yeast and human RAD50 compromised MRE11 functions. Furthermore, our demonstration that human RAD50^{E1035Δ} is a separation-of-function mutation that impairs DNA repair, DNA replication, and DNA end resection without affecting ATM-dependent DDR supports the idea that the integrity of the RAD50 coiled-coil domain is essential to enable switch of the MR intracomplex toward functional rod-shaped conformation promoting DNA clamping and DNA end resection (Hopfner,

2014; Käshammer et al., 2019; Park et al., 2017; Rojowska et al., 2014). Further studies using cryo-EM, atomic force, and high-throughput single-molecule microscopy are warranted to better characterized the structural hindrance caused by RAD50^{E1035Δ} and decipher the rules delineating communication among the hook, the coiled-coil, and the globular domains of the MR complex in mammals. Lastly, the development of a Rad50^{E1035Δ} mouse model should provide crucial information on the functional consequence of compromised Mre11-dependent DNA end resection *in vivo*.

STAR★METHODS

Detailed methods are provided in the online version of this paper and include the following:

- KEY RESOURCES TABLE
- RESOURCE AVAILABILITY
 - Lead Contact
 - Materials Availability
 - Data and Code Availability
- EXPERIMENTAL MODEL AND SUBJECT DETAILS
- METHOD DETAILS
 - Study approval
 - Cells
 - Yeast
 - Homology directed repair assay
 - Automated count of 53BP1 foci
 - Whole exome sequencing
 - Constructs and cDNA analysis
 - Coiled-coil probability
 - Complementation assay
 - Selective advantage assay
 - Western blotting
 - Immunofluorescence
 - G2/M checkpoint analysis
 - DNA repair analysis
 - DNA replication analysis
 - Stalled fork resection
 - Laser microirradiation
 - Cloning, expression and purification of recombinant proteins
 - Preparation of oligonucleotide-based substrate
 - Nuclease assay
 - ATPase assay
 - Electrophoretic mobility shift assays
- QUANTIFICATION AND STATISTICAL ANALYSIS

SUPPLEMENTAL INFORMATION

Supplemental Information can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.108559>.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank the patient and his family for their generous assistance with samples and information, which made this research possible. We acknowledge M. Garfa Traore and the imaging facility of the Imagine Institute for help with micro-laser irradiation, the Bioinformatics Department of the Imagine Institute for

help with whole-exome sequencing, N. Lambert (CEDI, AP-HP, Necker Hospital, Paris, France) for microsatellite analysis, and A. Fernandes from the Centre de Ressource Biologique of the Imagine Institute, who generated B-LCL. We thank Dr. B. Lopez for the RAD50 construct used as a matrix and technical advice for RAD51 and the RPA immunofluorescence study. We thank Dr. G. Dellaire for the HDR assay components (Pinder et al., 2015). Dr. P. Pasero is acknowledged for his advice with RCAs. P.R. thanks Dr. A. Decottignies, Dr. P. Kannouche, and Dr. E. Brunet for critical reading of the manuscript. Work performed in the GDIS lab was supported by institutional grants from INSERM, Ligue Nationale contre le Cancer (Equipe Labellisée “LIGUE 2020”), INCA (PLBIO19-027 and INCA_13766), and GIS-Institut des Maladies Rares and state funding from the Agence Nationale de la Recherche under the Investissements d’Avenir program (ANR-10-IAHU-01). This work was supported by GM56888 and MSK Cancer Center core grant P30 CA008748 (to J.H.J.P.) and the Swiss National Science Foundation (31003A_17544) and European Research Council grant 681-630 (to P.C.). M.M. is supported by the Ligue Nationale contre le Cancer (EL2028.LNCC/MaM) and the French National Cancer Institute (PLBIO2017-167). M.C.D.-C. benefited from scholarships from the Association Nationale de la Recherche et de la Technologie (ANRT) and La Ligue contre le Cancer. P.R. is a scientist from Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS).

AUTHOR CONTRIBUTIONS

M.C.D.-C. carried out most of the experimental work on human cells, assisted by L.K. and P.R. T.I. identified the affected patient and assisted with related clinical and laboratory studies. I.C. and P.C. produced the recombinant MRN complex and performed *in vitro* experiments. M.H. and J.H.J.P. conceived and performed experiments on yeast strains. P.R. conceived the project and wrote the manuscript, with editing contributions from J.-P.d.V., I.C., M.H., M.M., P.C., and J.H.J.P.

DECLARATION OF INTERESTS

The authors declare no competing interests.

Received: June 9, 2020

Revised: October 30, 2020

Accepted: December 4, 2020

Published: December 29, 2020

REFERENCES

- Adelman, C.A., De, S., and Petrini, J.H. (2009). Rad50 is dispensable for the maintenance and viability of postmitotic tissues. *Mol. Cell. Biol.* 29, 483–492.
- Anand, R., Ranjha, L., Cannavo, E., and Cejka, P. (2016). Phosphorylated CtIP Functions as a Co-factor of the MRE11-RAD50-NBS1 Endonuclease in DNA End Resection. *Mol. Cell* 64, 940–950.
- Anand, R., Pinto, C., and Cejka, P. (2018). Methods to Study DNA End Resection I: Recombinant Protein Purification. *Methods Enzymol.* 600, 25–66.
- Anand, R., Jasrotia, A., Bundschuh, D., Howard, S.M., Ranjha, L., Stucki, M., and Cejka, P. (2019). NBS1 promotes the endonuclease activity of the MRE11-RAD50 complex by sensing CtIP phosphorylation. *EMBO J.* 38, e101005.
- Anglana, M., Apiou, F., Bensimon, A., and Debatisse, M. (2003). Dynamics of DNA replication in mammalian somatic cells: nucleotide pool modulates origin choice and interorigin spacing. *Cell* 114, 385–394.
- Bianco, J.N., Poli, J., Saksouk, J., Bacal, J., Silva, M.J., Yoshida, K., Lin, Y.L., Tourrière, H., Lengronne, A., and Pasero, P. (2012). Analysis of DNA replication profiles in budding yeast and mammalian cells using DNA combing. *Methods* 57, 149–157.
- Broderick, R., Niemuszcz, J., Baddock, H.T., Deshpande, R., Gileadi, O., Paull, T.T., McHugh, P.J., and Niedzwiedz, W. (2016). EXD2 promotes homologous recombination by facilitating DNA end resection. *Nat. Cell Biol.* 18, 271–280.
- Bryant, H.E., Petermann, E., Schultz, N., Jemth, A.S., Loseva, O., Issaeva, N., Johansson, F., Fernandez, S., McGlynn, P., and Helleday, T. (2009). PARP is activated at stalled forks to mediate Mre11-dependent replication restart and recombination. *EMBO J.* 28, 2601–2615.
- Buis, J., Wu, Y., Deng, Y., Leddon, J., Westfield, G., Eckersdorff, M., Sekiguchi, J.M., Chang, S., and Ferguson, D.O. (2008). Mre11 nuclease activity has essential roles in DNA repair and genomic stability distinct from ATM activation. *Cell* 135, 85–96.
- Cannavo, E., and Cejka, P. (2014). Sae2 promotes dsDNA endonuclease activity within Mre11-Rad50-Xrs2 to resect DNA breaks. *Nature* 514, 122–125.
- Cannavo, E., Reginato, G., and Cejka, P. (2019). Stepwise 5’ DNA end-specific resection of DNA breaks by the Mre11-Rad50-Xrs2 and Sae2 nuclease ensemble. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 116, 5505–5513.
- Carney, J.P., Maser, R.S., Olivares, H., Davis, E.M., Le Beau, M., Yates, J.R., 3rd, Hays, L., Morgan, W.F., and Petrini, J.H. (1998). The hMre11/hRad50 protein complex and Nijmegen breakage syndrome: linkage of double-strand break repair to the cellular DNA damage response. *Cell* 93, 477–486.
- Cejka, P., and Kowalczykowski, S.C. (2010). The full-length *Saccharomyces cerevisiae* Sgs1 protein is a vigorous DNA helicase that preferentially unwinds Holliday junctions. *J. Biol. Chem.* 285, 8290–8301.
- Cejka, P., Cannavo, E., Polaczek, P., Masuda-Sasa, T., Pokharel, S., Campbell, J.L., and Kowalczykowski, S.C. (2010). DNA end resection by Dna2-Sgs1-RPA and its stimulation by Top3-Rmi1 and Mre11-Rad50-Xrs2. *Nature* 467, 112–116.
- Chen, L., Trujillo, K.M., Van Komen, S., Roh, D.H., Krejci, L., Lewis, L.K., Resnick, M.A., Sung, P., and Tomkinson, A.E. (2005). Effect of amino acid substitutions in the rad50 ATP binding domain on DNA double strand break repair in yeast. *J. Biol. Chem.* 280, 2620–2627.
- Coquel, F., Neumayer, C., Lin, Y.L., and Pasero, P. (2019). SAMHD1 and the innate immune response to cytosolic DNA during DNA replication. *Curr. Opin. Immunol.* 56, 24–30.
- Courbet, S., Gay, S., Arnoult, N., Wronka, G., Anglana, M., Brison, O., and Debatisse, M. (2008). Replication fork movement sets chromatin loop size and origin choice in mammalian cells. *Nature* 455, 557–560.
- de Jager, M., van Noort, J., van Gent, D.C., Dekker, C., Kanaar, R., and Wyman, C. (2001). Human Rad50/Mre11 is a flexible complex that can tether DNA ends. *Mol. Cell* 8, 1129–1135.
- de Jager, M., Trujillo, K.M., Sung, P., Hopfner, K.P., Carney, J.P., Tainer, J.A., Connelly, J.C., Leach, D.R., Kanaar, R., and Wyman, C. (2004). Differential arrangements of conserved building blocks among homologs of the Rad50/Mre11 DNA repair protein complex. *J. Mol. Biol.* 339, 937–949.
- Delamarre, A., Barthe, A., de la Roche Saint-André, C., Luciano, P., Forey, R., Padioleau, I., Skrzypczak, M., Ginalski, K., Géli, V., Pasero, P., et al. (2020). MRX Increases Chromatin Accessibility at Stalled Replication Forks to Promote Nascent DNA Resection and Cohesin Loading. *Mol. Cell* 77, 395–410.
- Delorenzi, M., and Speed, T. (2002). An HMM model for coiled-coil domains and a comparison with PSSM-based predictions. *Bioinformatics* 18, 617–625.
- Deshpande, R.A., Williams, G.J., Limbo, O., Williams, R.S., Kuhnlein, J., Lee, J.H., Classen, S., Guenther, G., Russell, P., Tainer, J.A., and Paull, T.T. (2014). ATP-driven Rad50 conformations regulate DNA tethering, end resection, and ATM checkpoint signaling. *EMBO J.* 33, 482–500.
- Deshpande, R.A., Lee, J.H., and Paull, T.T. (2017). Rad50 ATPase activity is regulated by DNA ends and requires coordination of both active sites. *Nucleic Acids Res.* 45, 5255–5268.
- Gatei, M., Jakob, B., Chen, P., Kijas, A.W., Becherel, O.J., Gueven, N., Birrell, G., Lee, J.H., Paull, T.T., Lerenthal, Y., et al. (2011). ATM protein-dependent phosphorylation of Rad50 protein regulates DNA repair and cell cycle control. *J. Biol. Chem.* 286, 31542–31556.
- Glousker, G., Touzot, F., Revy, P., Tzfati, Y., and Savage, S.A. (2015). Unraveling the pathogenesis of Hoyeraal-Hreidarsson syndrome, a complex telomere biology disorder. *Br. J. Haematol.* 170, 457–471.
- Hoa, N.N., Akagawa, R., Yamasaki, T., Hirota, K., Sasa, K., Natsume, T., Kobayashi, J., Sakuma, T., Yamamoto, T., Komatsu, K., et al. (2015). Relative

contribution of four nucleases, CtIP, Dna2, Exo1 and Mre11, to the initial step of DNA double-strand break repair by homologous recombination in both the chicken DT40 and human TK6 cell lines. *Genes Cells* 20, 1059–1076.

Hoa, N.N., Shimizu, T., Zhou, Z.W., Wang, Z.Q., Deshpande, R.A., Paull, T.T., Akter, S., Tsuda, M., Furuta, R., Tsutsui, K., et al. (2016). Mre11 Is Essential for the Removal of Lethal Topoisomerase 2 Covalent Cleavage Complexes. *Mol. Cell* 64, 580–592.

Hohl, M., Kwon, Y., Galván, S.M., Xue, X., Tous, C., Aguilera, A., Sung, P., and Petrini, J.H. (2011). The Rad50 coiled-coil domain is indispensable for Mre11 complex functions. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 18, 1124–1131.

Hohl, M., Kocharczyk, T., Tous, C., Aguilera, A., Krężel, A., and Petrini, J.H. (2015). Interdependence of the rad50 hook and globular domain functions. *Mol. Cell* 57, 479–491.

Hopfner, K.P. (2014). ATP puts the brake on DNA double-strand break repair: a new study shows that ATP switches the Mre11-Rad50-Nbs1 repair factor between signaling and processing of DNA ends. *BioEssays* 36, 1170–1178.

Hopfner, K.P., and Tainer, J.A. (2003). Rad50/SMC proteins and ABC transporters: unifying concepts from high-resolution structures. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 13, 249–255.

Hopfner, K.P., Karcher, A., Shin, D., Fairley, C., Tainer, J.A., and Carney, J.P. (2000). Mre11 and Rad50 from *Pyrococcus furiosus*: cloning and biochemical characterization reveal an evolutionarily conserved multiprotein machine. *J. Bacteriol.* 182, 6036–6041.

Hopfner, K.P., Craig, L., Moncalian, G., Zinkel, R.A., Usui, T., Owen, B.A., Karcher, A., Henderson, B., Bodmer, J.L., McMurray, C.T., et al. (2002). The Rad50 zinc-hook is a structure joining Mre11 complexes in DNA recombination and repair. *Nature* 418, 562–566.

Jasin, M., and Rothstein, R. (2013). Repair of strand breaks by homologous recombination. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 5, a012740.

Käshammer, L., Saathoff, J.-H., Lammens, K., Gut, F., Bartho, J., Alt, A., Kessler, B., and Hopfner, K.-P. (2019). Mechanism of DNA End Sensing and Processing by the Mre11-Rad50 Complex. *Mol. Cell* 76, 382–394.

Lammens, K., Bemeleit, D.J., Möckel, C., Clausing, E., Schele, A., Hartung, S., Schiller, C.B., Lucas, M., Angermüller, C., Söding, J., et al. (2011). The Mre11:Rad50 structure shows an ATP-dependent molecular clamp in DNA double-strand break repair. *Cell* 145, 54–66.

Lebofsky, R., and Bensimon, A. (2005). DNA replication origin plasticity and perturbed fork progression in human inverted repeats. *Mol. Cell. Biol.* 25, 6789–6797.

Lee, J.H., Mand, M.R., Deshpande, R.A., Kinoshita, E., Yang, S.H., Wyman, C., and Paull, T.T. (2013). Ataxia telangiectasia-mutated (ATM) kinase activity is regulated by ATP-driven conformational changes in the Mre11/Rad50/Nbs1 (MRN) complex. *J. Biol. Chem.* 288, 12840–12851.

Lim, H.S., Kim, J.S., Park, Y.B., Gwon, G.H., and Cho, Y. (2011). Crystal structure of the Mre11-Rad50-ATPγS complex: understanding the interplay between Mre11 and Rad50. *Genes Dev.* 25, 1091–1104.

Lisby, M., Barlow, J.H., Burgess, R.C., and Rothstein, R. (2004). Choreography of the DNA damage response: spatiotemporal relationships among checkpoint and repair proteins. *Cell* 118, 699–713.

Liu, Y., Sung, S., Kim, Y., Li, F., Gwon, G., Jo, A., Kim, A.K., Kim, T., Song, O.K., Lee, S.E., and Cho, Y. (2016). ATP-dependent DNA binding, unwinding, and resection by the Mre11/Rad50 complex. *EMBO J.* 35, 743–758.

Michalet, X., Ekong, R., Fougerousse, F., Rousseaux, S., Schurra, C., Hornigold, N., van Slegtenhorst, M., Wolfe, J., Povey, S., Beckmann, J.S., and Bensimon, A. (1997). Dynamic molecular combing: stretching the whole human genome for high-resolution studies. *Science* 277, 1518–1523.

Mirzoeva, O.K., and Petrini, J.H. (2001). DNA damage-dependent nuclear dynamics of the Mre11 complex. *Mol. Cell. Biol.* 21, 281–288.

Mokrani-Benhelli, H., Gaillard, L., Biasutto, P., Le Guen, T., Touzot, F., Vasquez, N., Komatsu, J., Conseiller, E., Picard, C., Gluckman, E., et al. (2013). Primary microcephaly, impaired DNA replication, and genomic instability caused by compound heterozygous ATR mutations. *Hum. Mutat.* 34, 374–384.

Myler, L.R., Gallardo, I.F., Soniat, M.M., Deshpande, R.A., Gonzalez, X.B., Kim, Y., Paull, T.T., and Finkelstein, I.J. (2017). Single-Molecule Imaging Reveals How Mre11-Rad50-Nbs1 Initiates DNA Break Repair. *Mol. Cell* 67, 891–898.

O'Driscoll, M. (2012). Diseases associated with defective responses to DNA damage. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 4, a012773.

Park, Y.B., Hohl, M., Padjasek, M., Jeong, E., Jin, K.S., Krężel, A., Petrini, J.H., and Cho, Y. (2017). Eukaryotic Rad50 functions as a rod-shaped dimer. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 24, 248–257.

Pasero, P., and Vindigni, A. (2017). Nucleases Acting at Stalled Forks: How to Reboot the Replication Program with a Few Shortcuts. *Annu. Rev. Genet.* 51, 477–499.

Paull, T.T. (2018). 20 Years of Mre11 Biology: No End in Sight. *Mol. Cell* 71, 419–427.

Paull, T.T., and Gellert, M. (1999). Nbs1 potentiates ATP-driven DNA unwinding and endonuclease cleavage by the Mre11/Rad50 complex. *Genes Dev.* 13, 1276–1288.

Pinder, J., Salsman, J., and Delleire, G. (2015). Nuclear domain 'knock-in' screen for the evaluation and identification of small molecule enhancers of CRISPR-based genome editing. *Nucleic Acids Res.* 43, 9379–9392.

Pinto, C., Anand, R., and Cejka, P. (2018). Methods to Study DNA End Resection II: Biochemical Reconstitution Assays. *Methods Enzymol.* 600, 67–106.

Ragamin, A., Yigit, G., Bousset, K., Beleggia, F., Verheijen, F.W., de Wit, M.Y., Strom, T.M., Dörk, T., Wollnik, B., and Mancini, G.M.S. (2020). Human RAD50 deficiency: Confirmation of a distinctive phenotype. *Am. J. Med. Genet. A.* 182, 1378–1386.

Rimmelé, P., Komatsu, J., Hupé, P., Roulin, C., Barillot, E., Dutreix, M., Conseiller, E., Bensimon, A., Moreau-Gachelin, F., and Guillof, C. (2010). Spi-1/PU.1 oncogene accelerates DNA replication fork elongation and promotes genetic instability in the absence of DNA breakage. *Cancer Res.* 70, 6757–6766.

Rivera-Munoz, P., Malivert, L., Derdouch, S., Azerrad, C., Abramowski, V., Revy, P., and Villartay, J.P. (2007). DNA repair and the immune system: From V(D)J recombination to aging lymphocytes. *Eur. J. Immunol.* 37 (Suppl 1), S71–S82.

Rojowska, A., Lammens, K., Seifert, F.U., Drenberger, C., Feldmann, H., and Hopfner, K.P. (2014). Structure of the Rad50 DNA double-strand break repair protein in complex with DNA. *EMBO J.* 33, 2847–2859.

Schurra, C., and Bensimon, A. (2009). Combing genomic DNA for structural and functional studies. *Methods Mol. Biol.* 464, 71–90.

Scully, R., Panday, A., Elango, R., and Willis, N.A. (2019). DNA double-strand break repair-pathway choice in somatic mammalian cells. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 20, 698–714.

Shibata, A., Moiani, D., Arvai, A.S., Perry, J., Harding, S.M., Genoia, M.M., Maity, R., van Rossum-Fikkert, S., Kertokallio, A., Romoli, F., et al. (2014). DNA double-strand break repair pathway choice is directed by distinct MRE11 nuclease activities. *Mol. Cell* 53, 7–18.

Shiloh, Y., and Lederman, H.M. (2017). Ataxia-telangiectasia (A-T): An emerging dimension of premature ageing. *Ageing Res. Rev.* 33, 76–88.

Simm, D., Hatje, K., and Kollmar, M. (2015). Waggawagga: comparative visualization of coiled-coil predictions and detection of stable single α -helices (SAH domains). *Bioinformatics* 31, 767–769.

Smogorzewska, A., Matsuoka, S., Vinciguerra, P., McDonald, E.R., 3rd, Hurov, K.E., Luo, J., Ballif, B.A., Gygi, S.P., Hofmann, K., D'Andrea, A.D., and Elledge, S.J. (2007). Identification of the FANCI protein, a monoubiquitinated FANCD2 paralog required for DNA repair. *Cell* 129, 289–301.

Stewart, G.S., Maser, R.S., Stankovic, T., Bressan, D.A., Kaplan, M.I., Jaspers, N.G., Raams, A., Byrd, P.J., Petrini, J.H., and Taylor, A.M. (1999). The DNA double-strand break repair gene hMRE11 is mutated in individuals with an ataxia-telangiectasia-like disorder. *Cell* 99, 577–587.

Stracker, T.H., and Petrini, J.H. (2011). The MRE11 complex: starting from the ends. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 12, 90–103.

- Syed, A., and Tainer, J.A. (2018). The MRE11-RAD50-NBS1 Complex Conducts the Orchestration of Damage Signaling and Outcomes to Stress in DNA Replication and Repair. *Annu. Rev. Biochem.* *87*, 263–294.
- Tatebe, H., Lim, C.T., Konno, H., Shiozaki, K., Shinohara, A., Uchihashi, T., and Furukohri, A. (2020). Rad50 zinc hook functions as a constitutive dimerization module interchangeable with SMC hinge. *Nat. Commun.* *11*, 370.
- Taylor, A.M.R., Rothblum-Oviatt, C., Ellis, N.A., Hickson, I.D., Meyer, S., Crawford, T.O., Smogorzewska, A., Pietrucha, B., Weemaes, C., and Stewart, G.S. (2019). Chromosome instability syndromes. *Nat. Rev. Dis. Primers* *5*, 64.
- Trenz, K., Smith, E., Smith, S., and Costanzo, V. (2006). ATM and ATR promote Mre11 dependent restart of collapsed replication forks and prevent accumulation of DNA breaks. *EMBO J.* *25*, 1764–1774.
- Truebestein, L., and Leonard, T.A. (2016). Coiled-coils: The long and short of it. *BioEssays* *38*, 903–916.
- Usui, T., Ogawa, H., and Petrini, J.H. (2001). A DNA damage response pathway controlled by Tel1 and the Mre11 complex. *Mol. Cell* *7*, 1255–1266.
- van Noort, J., van Der Heijden, T., de Jager, M., Wyman, C., Kanaar, R., and Dekker, C. (2003). The coiled-coil of the human Rad50 DNA repair protein contains specific segments of increased flexibility. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *100*, 7581–7586.
- Varon, R., Vissinga, C., Platzer, M., Cerosaletti, K.M., Chrzanowska, K.H., Saar, K., Beckmann, G., Seemanová, E., Cooper, P.R., Nowak, N.J., et al. (1998). Nibrin, a novel DNA double-strand break repair protein, is mutated in Nijmegen breakage syndrome. *Cell* *93*, 467–476.
- Waltes, R., Kalb, R., Gatei, M., Kijas, A.W., Stumm, M., Sobeck, A., Wieland, B., Varon, R., Lerenthal, Y., Lavin, M.F., et al. (2009). Human RAD50 deficiency in a Nijmegen breakage syndrome-like disorder. *Am. J. Hum. Genet.* *84*, 605–616.
- Wiltzius, J.J., Hohl, M., Fleming, J.C., and Petrini, J.H. (2005). The Rad50 hook domain is a critical determinant of Mre11 complex functions. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *12*, 403–407.
- Yang, Y.G., Frappart, P.O., Frappart, L., Wang, Z.Q., and Tong, W.M. (2006). A novel function of DNA repair molecule Nbs1 in terminal differentiation of the lens fibre cells and cataractogenesis. *DNA Repair (Amst.)* *5*, 885–893.
- Zhang, S., Pondarre, C., Pennarun, G., Labussiere-Wallet, H., Vera, G., France, B., Chansel, M., Rouvet, I., Revy, P., Lopez, B., et al. (2016). A nonsense mutation in the DNA repair factor Hebo causes mild bone marrow failure and microcephaly. *J. Exp. Med.* *213*, 1011–1028.
- Zhao, W., Wiese, C., Kwon, Y., Hromas, R., and Sung, P. (2019). The BRCA Tumor Suppressor Network in Chromosome Damage Repair by Homologous Recombination. *Annu. Rev. Biochem.* *88*, 221–245.
- Zhu, Z., Chung, W.H., Shim, E.Y., Lee, S.E., and Ira, G. (2008). Sgs1 helicase and two nucleases Dna2 and Exo1 resect DNA double-strand break ends. *Cell* *134*, 981–994.

STAR★METHODS

KEY RESOURCES TABLE

REAGENT or RESOURCE	SOURCE	IDENTIFIER
Antibodies		
Alexa Fluor 488 goat F[Ab] ₂	Invitrogen	A31556
Anti-53BP1	Novus Biological	NB100-304; RRID: AB_10003037
Anti-vinculin	Santa Cruz	SC73614; RRID: AB_1131294
Anti-MRE11	Novus	NB100-473; RRID: AB_10001780
Anti-RAD50	Genetex	GTX 70228; RRID: AB_372854
Anti-NBS1	Novus	NB100-143E1; RRID: AB_350080
Anti-CHK2	Santa Cruz	SC17748; RRID: AB_627260
Goat anti-rabbit Ig IRDye 800CW Infrared Dye	Li-Cor	926-32211; RRID: AB_621843
Anti-Phospho-KAP1	Bethyl	S824 IHC 00073; RRID: AB_577234
Anti-RAD51	Millipore Calbiochem	PC130; RRID: AB_2238184
Anti-RPA32	Bethyl	A300-244A; RRID: AB_185548
Anti-BrdU	Abcam	clone BU1/75-ICR, Ab6326; RRID: AB_305426
Cy5 goat anti rat Ig	Abcam	AB6565; RRID: AB_955063
Cy3.5 goat anti mouse Ig	Abcam	AB6946; RRID: AB_955045
Anti-ssDNA antibodies	Merck Millipore	MAB3034; RRID: AB_94645
Anti-P-H3	Millipore	06-570; RRID: AB_310177
Anti-KU70	Thermo Scientific Pierce	MA5-13110; RRID: AB_10976973
Anti-Phospho-NBS1	Cell Signaling	3001S; RRID: AB_10829154
Chemicals, Peptides, and Recombinant Proteins		
Triton X-100	Sigma	101958312
4'-6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride	Thermo Scientific	62248
Phleomycin	InvivoGen	11006-33-0
MMC	Sigma	M0503
Etoposide	Sigma	E1383
IdU	Sigma	I-7125
CldU	Sigma	C-6891
Fluorsave	Calbiochem	345789
Bradford	Bio-Rad	500-0006
Protease Inhibitor	Roche	4693159001
Phosphatase inhibitor #1	Sigma	P0044-5ML
Phosphatase inhibitor #2	Sigma	P5726-5ML
PBS	GIBCO	70011-36
PFA	Sigma	1002491639
Glycine	Euromedex	26-1286405C
BSA	Sigma	A2153-100G
Trizol	Ambion	15596026
Tris	Invitrogen	15504-020
EDTA	Invitrogen	15575-038
Blocking buffer (TBS)	Li-Cor	927-60001
Tween-20	MP Biochemicals	103168
Ethanol	VWR	20821.330
IP	Sigma	P4864
Protéinase K	Invitrogen	P100005393

(Continued on next page)

Continued

REAGENT or RESOURCE	SOURCE	IDENTIFIER
β -Agarase	New England Biolabs	M0392S
BrdU	Becton Dickinson	550891
Critical Commercial Assays		
jetPRIME	PolyPlus Transfection	114-07
FluorSave	Calbiochem	345789
SureSelect Human All Exon Kit	Agilent Technologies	V5
SuperScript First-Strand Synthesis Kit	Invitrogen	18064-014
QuikChange site-directed mutagenesis kit	Agilent Technologies	200521
Experimental Models: Cell Lines		
<i>Spodoptera frugiperda</i> 9 (Sf9) cells	Cejka lab	N/A
HT1080	Revy Lab	N/A
HT1080 RAD50 ^{+/-}	This paper	N/A
HT1080 RAD50 ^{-/-} del669-672	This paper	N/A
Primary fibroblast from healthy donor	This paper	N/A
Primary fibroblast from patient P1	This paper	N/A
SV40-transformed hTERT-immortalized fibroblast from healthy donor	This paper	N/A
SV40-transformed hTERT-immortalized fibroblast from patient P1	This paper	N/A
SV40-transformed hTERT-immortalized fibroblast from healthy donor transduced with pLVX-IRES-mCherry	This paper	N/A
SV40-transformed hTERT-immortalized fibroblast from patient P1 transduced with pLVX-IRES-mCherry	This paper	N/A
SV40-transformed hTERT-immortalized fibroblast from healthy donor transduced with pLVX-wtRAD50-IRES-mCherry	This paper	N/A
SV40-transformed hTERT-immortalized fibroblast from patient P1 transduced with pLVX- wtRAD50-IRES-mCherry	This paper	N/A
All <i>S.cerevisiae</i> strains used in this study are listed in Table S2	This paper	N/A
Experimental Models: Organisms/Strains		
All <i>S.cerevisiae</i> strains used in this study are listed in Table S2	This paper	N/A
Oligonucleotides		
codon-optimized oligonucleotides for recombinant protein: RAD50_ΔE1035_F (5'- AACGAGGAGCT GAAGGAGGTGGAGGAGCGAAAGCAGCACCTG-3')	This paper	N/A
Recombinant DNA		
PGK-H2BmCherry	Addgene	#21217
pX330-LMNA-gRNA1	Addgene	#122507
pCR2.1 Clover-LMNA donor	Addgene	#122508
pLVX-EF1alpha-IRES-mCherry	Takara Bio	631987
pLVX-EF1a-wtRAD50-IRES-mCherry	This paper	N/A
pX330-hRAD50-gRNA	This paper	N/A
pEGFPN1-NBS1	Lukas lab	N/A
pEGFP-NLS	Zhang et al., 2016	N/A
pLV-hTERT-IRES-hygro	Addgene	#85140
Software and Algorithms		
FlowJo	FlowJo	V10.1
GraphPad Prism version 8	GraphPad	V6.0

(Continued on next page)

Continued

REAGENT or RESOURCE	SOURCE	IDENTIFIER
FiberStudio®	Genomic Vision	V2.0
Marcoil program	Delorenzi and Speed, 2002	https://waggawagga.motorprotein.de/
ImageJ	ImageJ	https://imagejimagej.net/Welcome
Other		
FiberVision® scanner	Genomic Vision	SCN-002
FiberComb® Molecular Combing System	Genomic Vision	MCS-001

RESOURCE AVAILABILITY

Lead Contact

Further information and requests for resources and reagents should be directed to and will be fulfilled by the Lead Contact, Patrick Revy (patrick.revy@inserm.fr).

Materials Availability

All unique/stable reagents generated in this study are available from the Lead Contact with a completed Materials Transfer Agreement.

Data and Code Availability

All used software is listed in the [Key Resources Table](#). This study did not generate any unique datasets or new code.

EXPERIMENTAL MODEL AND SUBJECT DETAILS

Human fibroblasts used in this study were obtained from skin biopsies from pediatric healthy donors (3 years of age) and patients. When indicated transformed (with large T antigen from SV40T) and immortalized (after transduction with a hTERT-expressing vector, Addgene #85140) fibroblasts were used. All cell lines were from male individuals and were checked for mycoplasma contamination. Informed and written consent was obtained from donors and patients. The study and protocols comply with the 1975 Declaration of Helsinki as well as with the local legislation and ethical guidelines from the Comité de Protection des Personnes de l'Île de France II and the French advisory committee on data processing in medical research.

Saccharomyces cerevisiae strains used in this paper are listed in [Table S2](#). Yeast strains were grown in liquid cultures and on plates in YPD media supplemented with 100 mg/L adenine. Further specifications are mentioned within the [Method Details](#) section.

METHOD DETAILS

Study approval

Informed and written consent was obtained from donors and patients. The study and protocols comply with the 1975 Declaration of Helsinki as well as with the local legislation and ethical guidelines from the Comité de Protection des Personnes de l'Île de France II and the French advisory committee on data processing in medical research.

Cells

Control fibroblasts were obtained from skin biopsies from pediatric healthy donors (3 years of age). When indicated transformed (with large T antigen from SV40T) and immortalized (after transduction with a hTERT-expressing vector, Addgene #85140) fibroblasts were used. All cell lines were checked for mycoplasma contamination.

Yeast

Yeast strains were generated by integration of the *rad50*-coiled coil mutants at their native chromosomal locus in a diploid *WT* strain. *rad50* mutant spores were obtained by tetrad dissection and verified by PCR genotyping and sequencing using genomic DNA. Details of yeast strains and plasmid constructions are available upon request. All strains used in this study are listed in [Table S2](#). Yeast strains were grown in liquid cultures and on plates in YPD media supplemented with 100 mg/L adenine. 5-fold serial cell dilutions (250,000 cells per spot to 80 cells per spot) were spotted on plates without or with S-phase clastogens and plates were incubated for 3 days (30°C) or 2 days (37°C). Mre11 complex co-immunoprecipitation were done as described previously ([Hohl et al., 2011](#)). Telomere lengths were assessed following 40 generation of growth using PstI-digested genomic DNA by Southern blot using a telomere specific probe as previously described ([Hohl et al., 2011](#)).

Homology directed repair assay

Cells were plated in 6 well plates and transfected in triplicate with jetPRIME (Polyplus transfection) according to the manufacturer's instructions. 1 μ g of mCherry vector (PGK-H2BmCherry, Addgene #21217), 4 μ g of CRISPR/cas9 vector (pX330-LMNA-gRNA1, Addgene #122507) and 1 μ g of donor vector (pCR2.1 Clover-LMNA donor, Addgene #122508) were used. The percent of clover-positive cells among the transfected cells (inferred by mCherry staining) was analyzed by flow cytometry using a LSR-Fortessa FACS (BD Biosciences) and results were plotted using the FlowJo software. Statistical significance was determined using the Student's t test.

Automated count of 53BP1 foci

Early passaged primary fibroblasts were cultured on coverslips for 24h. Cells were washed with PBS, fixed with 4% paraformaldehyde for 15 minutes and incubated for 20 minutes with PBS/0.1 mol/L glycine. Cells were then permeabilized in 0.5% Triton X-100 in PBS for 15 minutes. After each step, coverslips were rinsed 3 times with PBS. Thereafter, cells were incubated for 30 minutes with PBS-BSA 1% and labeled (45 minutes) with primary antibody (Anti-53BP1; Novus Biological ; NB100-304). Cells were washed with PBS/BSA 1% solution and incubated (30 minutes) with secondary antibody (Alexa Fluor 488 goat F[Ab]₂; Molecular Probes). Slides were stained for 5 minutes with 0.1 μ g/mL 4'-6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride and mounted in FluorSave (Calbiochem). Slides were analyzed by using the FiberVision® scanner (Genomic Vision). Nucleus and foci were automatically detected and visualized in the FiberStudio® (Genomic Vision) software. Statistical significance was determined using the Student's t test.

Whole exome sequencing

Exome capture was performed using the SureSelect Human All Exon Kit (Agilent Technologies, Santa Clara, CA). Agilent SureSelect Human All Exon (54 Mb, Clinical research Exome) libraries were prepared from 3 μ g of genomic DNA sheared with an Ultrasonicator (Covaris, Woburn, MA) as recommended by the manufacturer. Barcoded exome libraries were pooled and sequenced using a HiSeq2500 (Illumina, San Diego, CA) generating 130 \times 130 paired-end reads. After demultiplexing, sequences were mapped on the human genome reference (NCBI build37/hg19 version) with BWA. The mean depth of coverage obtained from the exome library was 138X with > 99% of the targeted exonic bases covered by at least 15 independent reads and > 97% by at least 30 independent sequencing reads (> 99% at 15 \times and > 97% at 30 \times). Variant calling was carried out with the Genome Analysis Toolkit (GATK), SAMtools, and Picard Tools. Single nucleotide variants were called with GATK Unified Genotyper, whereas indel calls were made with the GATK IndelGenotyper_v2. All variants with a read coverage \leq 2 \times and a Phred-scaled quality of \leq 20 were filtered out. All the variants were annotated and filtered using Polyweb, an in-house developed annotation software.

Constructs and cDNA analysis

Total RNA from patient and control fibroblasts or B-LCL was extracted using TRIzol reagent (Invitrogen, Grand Island, NY) according to the manufacturer's instructions. Reverse transcription was performed using a SuperScript First-Strand Synthesis Kit (Invitrogen). Nucleotide numbering reflects cDNA numbering with +1 corresponding to the A of the ATG translation initiation codon in the reference sequence. The initiation codon is codon 1. RAD50 ORF was PCR-amplified from cDNA and cloned into a pLVX-EF1 α -mCherry-lentiviral vector (Invitrogen) for complementation experiments.

Coiled-coil probability

Marcoil program (<https://waggawagga.motorprotein.de/>) (Delorenzi and Speed, 2002; Simm et al., 2015) was used to predict coiled-coil probability.

Complementation assay

For complementation of phleomycin sensitivity, patients' SV40-transformed fibroblasts were transduced with a wtRAD50-IRES-mCherry expressing lentivirus vector (pLVX-EF1 α -IRES-mCherry Vector, Takara Bio) or empty mCherry-expressing vector. Cells were cell sorted thanks to mCherry expression to obtain 100% of transduced cells. Sensitivity assays were then conducted as described above.

Selective advantage assay

Selective advantage was performed through multicolor competition assay as previously described (Smogorzewska et al., 2007; Zhang et al., 2016). Fibroblasts were transduced with a RAD50-IRES-mCherry expressing lentivirus vector (pLVX-EF1 α -IRES-mCherry Vector, Takara Bio) or mCherry-expressing vector and treated or not with 100 ng/ml phleomycin for up to 18 days. The number of mCherry-positive cells was scored at various time points to assess for relative selective advantage of transduced (mCherry⁺) over untransduced (mCherry⁻) cells.

Western blotting

Cells were lysed for 20 min on ice in lysis buffer containing 50 mM Tris (pH 8.0), 2 mM EDTA, 1% Triton X-100, 1% phosphatase inhibitor cocktails (Sigma), and protease inhibitors (Roche). After centrifugation, the supernatant was harvested and protein

concentration was quantified with the Bradford assay. After SDS–PAGE, proteins were transferred to PVDF Immobilon-P membrane (Millipore). Then, the membrane was incubated for 1 h in Odyssey blocking buffer (TBS), followed by incubation with the appropriate antibody, then washed and incubated with goat anti-rabbit secondary antibody (Li-Cor IRDye 800CW Infrared Dye, 1:10,000 dilution). The presence of proteins was detected by infrared fluorescence according to the manufacturer's protocol (Odyssey CLx Imaging System). The blot was then incubated with anti-vinculin (Santa Cruz, SC73614; 1:1,000) as loading control. The antibodies used for WB analysis were anti-MRE11 (Novus 12D7, NB100-473; 1:500), anti-RAD50 (Genetex 13B3, GTX 70228; 1:500), anti-NBS1 (Novus, NB100-143E1; 1:500), anti-CHK2 (Santa Cruz, SC17748; 1:1,000).

Immunofluorescence

For P-KAP1, RPA32 and RAD51 detection, cells were cultured on coverslips 24 h before experiments and treated with 10 Gy of IR (^{137}Cs) with a 6 h incubation post IR. Cells were pre-permeabilized with PBS/0.5% Triton X-100 on ice for 5 minutes and fixed with 2% paraformaldehyde for 15 minutes at RT under agitation. Cells were then permeabilized in PBS/0.5% Triton X-100 for 5 minutes under agitation. Thereafter, cells were incubated for 30 minutes with PBS/BSA 2%/Tween 0.05% with agitation and labeled 1 h in humid chamber at 37°C with primary antibodies (anti-P-KAP1, Bethyl, S824 IHC 00073, 1/200; anti-RAD51, Millipore Calbiochem, PC130, 1/200; anti-RPA32, Bethyl, A300-244A, 1/200). Cells were then washed 10 minutes 3 times with PBS/Tween 0.05% solution under agitation and incubated 45 minutes in humid chamber at 37°C with secondary antibody (Alexa Fluor 488 goat F[Ab]₂; Molecular Probes, 1/1000). Slides were washed 10 minutes 3 times under agitation with PBS/Tween 0.05%, stained for 5 minutes with 0.1 μg/mL 4'-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride and mounted in FluorSave (Calbiochem). Slides were analyzed by using epifluorescence microscopy (Axioplan; Zeiss, Oberkochen, Germany). Images were processed for quantification with ImageJ software.

G2/M checkpoint analysis

3.10⁵ immortalized SV40-transformed fibroblasts were harvested 1 hr after 5 Gy X-irradiation, washed with PBS, fixed with cold 70% ethanol, and kept at –20°C for 16 hr. After washing, the cells were resuspended in PBS 0.25% with Triton X-100 and incubated on ice for 15 min. Cells were washed in PBS and incubated with 1 mg of anti-phospho-H3 in PBS-1% BSA for 3 hr. Anti-P-H3 was detected with FITC-conjugated F(Ab)₂ goat anti-rabbit IgG antibody. The cells were washed and resuspended in PBS containing 25 mg/ml PI. Fluorescence was measured by using a Becton Dickinson FACScan flowcytometer.

DNA repair analysis

Cells were plated at 25,000 per well in 48 wells plates and imaged for 7 days using the Incucyte Live-Cell Analysis System upon exposure to radiation (X-ray) or increased doses of phleomycin (invivoGen, 11006-33-0), MMC (Sigma, M0503) or etoposide (Sigma, E1383).

DNA replication analysis

Cells were sequentially pulse labeled with 25 μM CldU (Sigma, C-6891) and 25 μM IdU (Sigma, I-7125) for 30 min (or 15 min when indicated) as previously described by [Lebofsky and Bensimon \(2005\)](#). Cells were harvested and embedded in low-melting agarose plugs in which DNA was subjected to deproteinization by Proteinase K treatment. Agarose was then removed by digestion with Agarase and the high molecular DNA yielded was used for combing as previously described by [Michalet et al. \(1997\)](#) by using the FiberComb Molecular Combing System (Genomic Vision). CldU and IdU was respectively stained with rat anti-BrdU antibody (clone BU1/75-ICR, Ab6326) and mouse anti-BrdU (BD Biosciences 347580), followed by staining with Cy5 goat anti rat Ig (AB6565) and Cy3.5 goat anti mouse Ig (AB6946). DNA fibers were counterstained with anti-ssDNA antibodies (Merck Millipore MAB3034) to distinguish fork pausing/stalling from fiber breakage. DNA fibers were visualized using the FiberVision scanner (Genomic Vision). Data analysis was performed as described by [Rimmelé et al. \(2010\)](#).

Stalled fork resection

Cells were sequentially pulse labeled with 25 μM CldU (Sigma, C-6891) and 25 μM IdU (Sigma, I-7125) for 15 min and treated with HU (4mM) for 3h. Forks were then detected as described in the “DNA replication analysis” section. The ratio between CldU and IdU track lengths was calculated and statistical significance was determined using the Student's t test.

Laser microirradiation

NBS1-EGFP plasmids were provided by C. Lukas (University of Copenhagen, Copenhagen, Denmark). SV40-transformed fibroblasts were transfected with NBS1-GFP or NLS-GFP constructs using Jet Prime reagent (Polyplus transfection). 24 h after transfection, cells were pre-sensitized with BrdU (BD) for another 28 h. Microirradiation was performed using a 405-nm UV laser focused through a 63 × objective lens in a confocal microscope system (TCS sp8; Leica Biosystems). Laser settings (100% laser power for 10% of laser duration) were used to generate DNA damage specifically at the laser path (dot) in a BrdU-dependent manner. The cells were analyzed in time course mode with a 0.329 s interval between pictures for up to 215 pictures. The interval between pictures was then shifted to 30 s for another 15 pictures. Images were exported as LIF files and analyzed using ImageJ.

Cloning, expression and purification of recombinant proteins

Recombinant MR wild-type, MBP-NBS1-his and phosphorylated CtIP were expressed in insect *Spodoptera frugiperda* 9 (*Sf9*) cells and purified by affinity and ion exchange chromatography as described previously (Anand et al., 2016, 2018, 2019). The RAD50^{E1035Δ} mutant was prepared by mutating the respective codon-optimized pFastBac plasmid by QuikChange site-directed mutagenesis kit following manufacturer's instructions (Agilent Technology) and using codon-optimized oligonucleotides RAD50_ΔE1035_F (5'-AACGAGGAGCTGAAGGAGGTGGAGGAGCGAAAGCAGCACCTG-3') and RAD50_ΔE1035_R (5'-CAGGTGCTGCTTTGCTCC TCCACCTCCTTCAGCTCCTCGTT-3') BamCids, primary and secondary baculoviruses were prepared using standard procedures according to manufacturer's instructions (Bac-to-Bac, Life Technologies). MRE11-RAD50(E1035Δ) heterodimer was purified as described for MR wild-type (Anand et al., 2018). Where indicated, 1 μg of pCtIP was dephosphorylated in 20 μL reactions with 200 units of λ phosphatase (λ-PP, New England Biolabs) in 1x PMP buffer (New England Biolabs) supplemented with 1 mM magnesium chloride for 15 min at 30°C. For "mock" control, λ-PP was excluded from the reaction.

Preparation of oligonucleotide-based substrate

All oligonucleotides were purified by polyacrylamide gel electrophoresis and purchased from Eurogentec. The labeling of oligonucleotides at the 5' end was carried out by T4 polynucleotide kinase (New England Biolabs) and [γ-32P] ATP (Perkin Elmer). To prepare quadruple blocked 70-bp long DNA substrate, PC210 and PC211 oligonucleotides were used, as described previously (Cannavo and Cejka, 2014). To prepare 50-bp long dsDNA substrate, X12-3 was labeled at 5' end and annealed with X12-4C (Cejka and Kowalczykowski, 2010).

Nuclease assay

Endonuclease assays (15 μL volume) were performed in nuclease buffer containing 25 mM Tris-HCl pH 7.5, 5 mM magnesium acetate, 1 mM manganese acetate, 1 mM dithiothreitol (DTT), 1 mM ATP, 0.25 mg/mL BSA (New England Biolabs), 1 mM phosphoenolpyruvate (Sigma), 80 U/mL pyruvate kinase (Sigma), and 1 nM oligonucleotide-based DNA substrate (in molecules). The reactions were supplemented with 15 nM streptavidin (Sigma), and incubated for 5 min at room temperature to block the biotinylated ends of the DNA substrates. The recombinant proteins were then added to the reactions on ice and samples were incubated at 37°C for 30 min. Reactions were stopped by adding 0.5 μL ethylenediaminetetraacetic (0.5 M EDTA) and 1 μL Proteinase K (19 mg/mL, Roche), and incubated at 50°C for 30 min. Finally, 16.5 μL loading buffer (5% formamide, 20 mM EDTA, bromophenol blue) was added to all samples and the products were separated on 15% polyacrylamide denaturing urea gels (19:1 acrylamide-bisacrylamide, Bio-Rad), as described (Pinto et al., 2018). The gels were fixed in fixing solution (40% methanol, 10% acetic acid, 5% glycerol) for 30 min at room temperature and dried. The dried gels were exposed to storage phosphor screen (GE Healthcare) and scanned by a Typhoon Phosphor Imager (FLA 9500, GE Healthcare). For salt titration experiment, NaCl was added as indicated before starting the incubation at 37°C. Exonuclease assays with 50-bp long dsDNA substrate were carried out similarly except the reaction buffer does not contained streptavidin and incubation time was extended to 1 h.

ATPase assay

The ATPase assays were performed in 25 mM Tris-HCl (pH 7.5), 5 mM magnesium acetate, 1 mM DTT, 0.1 mg/ml BSA (New England Biolabs), 80 mM NaCl, 8% glycerol, 50 μM ATP, 1 nM of [γ-32P] adenosine 5-triphosphate (Perkin Elmer) and 1 nM (in molecules) of the pUC19 plasmid linearized with EcoRI restriction endonuclease (NEB). Recombinant proteins were added on ice and samples were incubated at 37°C for 2 hours. Reactions were stopped with 1.1 μL of 0.5 M EDTA and separated using TLC plates (Merk) and 0.3 M LiCl and 0.3 M formic acid as mobile phase. Dried plates were exposed to storage phosphor screens (GE Healthcare) and scanned by a Typhoon 9500 phosphorimager (GE Healthcare).

Electrophoretic mobility shift assays

The reactions (15 μL volume) were performed in binding buffer containing 25 mM Tris-HCl pH 7.5, 5 mM magnesium acetate, 2 mM manganese acetate, 1 mM DTT, 1 mM ATP, 0.25 mg/ml BSA (New England Biolabs) and 1 nM DNA substrate (in molecules). The reactions were incubated on ice for 15 min. Loading dye (50% glycerol, bromophenol blue) was added and the products were separated by 0.6% agarose gel electrophoresis in Tris-Acetate-EDTA (TAE) buffer. The electrophoresis was carried out in the cold room at 4°C. The gels were squeeze for 15 min and dried on DE81 chromatography paper (Whatman, UK). The dried gels were then exposed to Storage Phosphor screens (GE Healthcare) and scanned by Typhoon Phosphor Imager (FLA 9500, GE Healthcare). When indicated, phosphorylated pCtIP was pretreated with λ phosphatase (λ-PP, New England Biolabs) as described above.

QUANTIFICATION AND STATISTICAL ANALYSIS

Statistical analyses were performed on Prism (GraphPad Software). Groups were analyzed by Student t test or Mann-Whitney test as indicated in figure legends and text, and the difference was considered statistically significant for $p < 0.05$. All of the statistical details of experiments can be found in the figure legends.

Cell Reports, Volume 33

Supplemental Information

**A Disease-Causing Single Amino Acid Deletion
in the Coiled-Coil Domain of RAD50 Impairs
MRE11 Complex Functions in Yeast and Humans**

Marie Chansel-Da Cruz, Marcel Hohl, Ilaria Ceppi, Laëtitia Kermasson, Laurence Maggiorella, Mauro Modesti, Jean-Pierre de Villartay, Talia Ileri, Petr Cejka, John H.J. Petrini, and Patrick Revy

Table S1. Hematological and immunological features of patient P1's, related to Figure 1.
In bold are represented the values found out of normal range in the individual P1.

	Patient	Normal values
Hematological features		
White blood cells (WBC) (G/L)	3,1	5-14.5
Neutrophils (G/L)	1	1.5-8
Lymphocytes (G/L)	1,6	1.5-7
Platelets (G/L)	113	150-450
Hg (g/dL)	10.9	11.5-15.5
	Patient	Normal values
Immunological features		
T lymphocytes (CD3+)%	93	60-76 (%)
CD3+/CD4+%	29	31-47 (%)
CD3+/CD8+%	47	18-35 (%)
Naive T lymphocytes		
CD4+ (CD3+/CD31+CD45RA+) %	15	43-55 (%)
CD8+ (CD3+/CCR7+CD45RA+) %	20	52-68 (%)
Central memory T cells		
CD3+/CCR7-CD45RA-/CD8+%	55	11-20 (%)
B lymphocytes (CD19+) %	0.2	4.8-24.3 (%)
NK lymphocytes (CD16+ CD56+) %	6.5	4-17 (%)

Table S2. *S. cerevisiae* strains used in this study, related to STAR Methods section.

All strains were in the W303+ background:

trp1-1 leu2-3,112 ura3-1 can1-100 ade2-1 his3-11,15 RAD5.

Strain ID	Genotype	Source
JPY4598	<i>MATa WT</i>	Lab Stock
JPY1836	<i>MATa rad50ΔKanMX</i>	Lab Stock
JPY6966	<i>MATa rad50-E1042Δ::HYG</i>	this study
JPY6968	<i>MATa rad50-E1042A::HYG</i>	this study
JPY6970	<i>MATa rad50-E1042K::HYG</i>	this study
JPY6972	<i>MATa rad50-E1044Δ::HYG</i>	this study
JPY6944	<i>MATa/α RAD50/ rad50-E1042Δ::HYG</i>	this study
JPY6945	<i>MATa/α RAD50/ rad50-E1042A::HYG</i>	this study
JPY6946	<i>MATa/α RAD50/ rad50-E1042K::HYG</i>	this study
JPY6947	<i>MATa/α RAD50/ rad50-E1044Δ::HYG</i>	this study
JPY6535	<i>MATα mec1ΔTRP1 sml1ΔHIS3 FLAG-RAD53::LEU2</i>	Lab Stock
JPY6536	<i>MATa mec1ΔTRP1 sml1ΔHIS3 sae2ΔKanMX FLAG-RAD53::LEU2</i>	Lab Stock
JPY6976	<i>MATa rad50-E1042Δ::HYG mec1ΔTRP1 sml1ΔHIS3 FLAG-RAD53::LEU2</i>	this study
JPY6977	<i>MATa rad50-E1042Δ::HYG mec1ΔTRP1 sml1ΔHIS3 sae2ΔKanMX FLAG-RAD53::LEU2</i>	this study
JPY6978	<i>MATa rad50-E1042A::HYG mec1ΔTRP1 sml1ΔHIS3 FLAG-RAD53::LEU2</i>	this study
JPY6979	<i>MATa rad50-E1042A::HYG mec1ΔTRP1 sml1ΔHIS3 sae2ΔKanMX FLAG-RAD53::LEU2</i>	this study
JPY6980	<i>MATa rad50-E1042K::HYG mec1ΔTRP1 sml1ΔHIS3 FLAG-RAD53::LEU2</i>	this study
JPY6981	<i>MATa rad50-E1042K::HYG mec1ΔTRP1 sml1ΔHIS3 sae2ΔKanMX FLAG-RAD53::LEU2</i>	this study
JPY6980	<i>MATa rad50-E1044Δ::HYG mec1ΔTRP1 sml1ΔHIS3 FLAG-RAD53::LEU2</i>	this study
JPY6981	<i>MATa rad50-E1044Δ::HYG mec1ΔTRP1 sml1ΔHIS3 sae2ΔKanMX FLAG-RAD53::LEU2</i>	this study

Figure S1

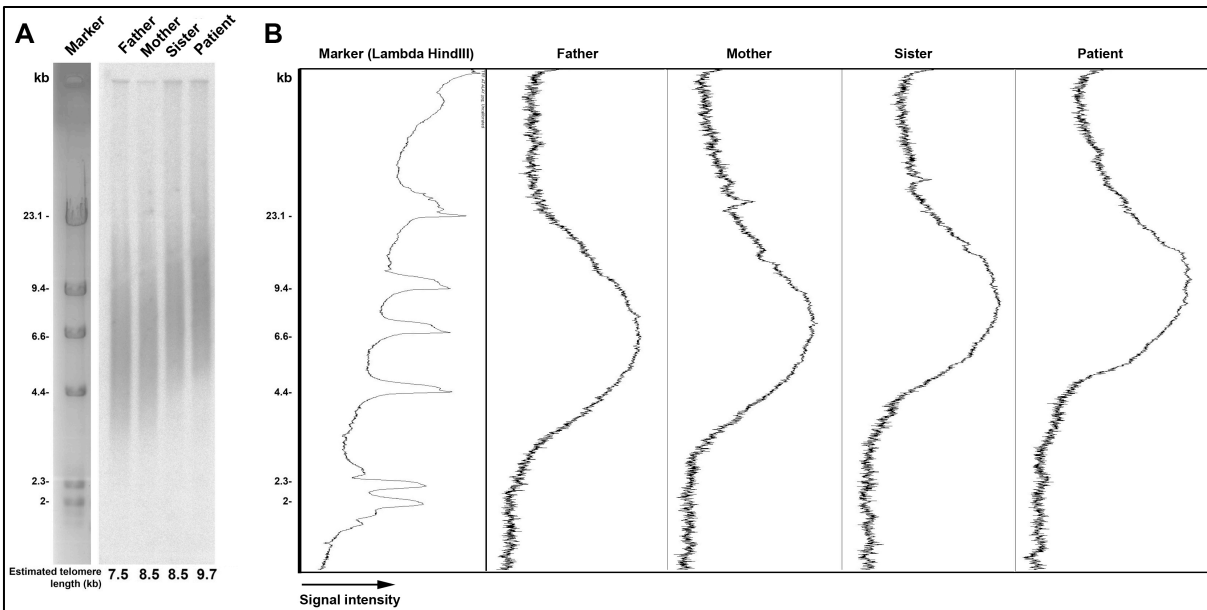


Figure S1. Telomere length in blood cells from P1 and his family, related to Figure 1. (A) Mean telomere length of whole blood cells from the patient, his parents, and his healthy sister were estimated by the TRF method. The estimated telomere length is indicated. DNA from the P1's brother was not available. **(B)** Plots of the signal intensity obtained by TRF used to estimate the telomere length. The age of individuals at time of DNA sampling was: Father, 35 years old; Mother, 30 years old; Sister, 12 years old; Patient P1, 8 years old.

Figure S2

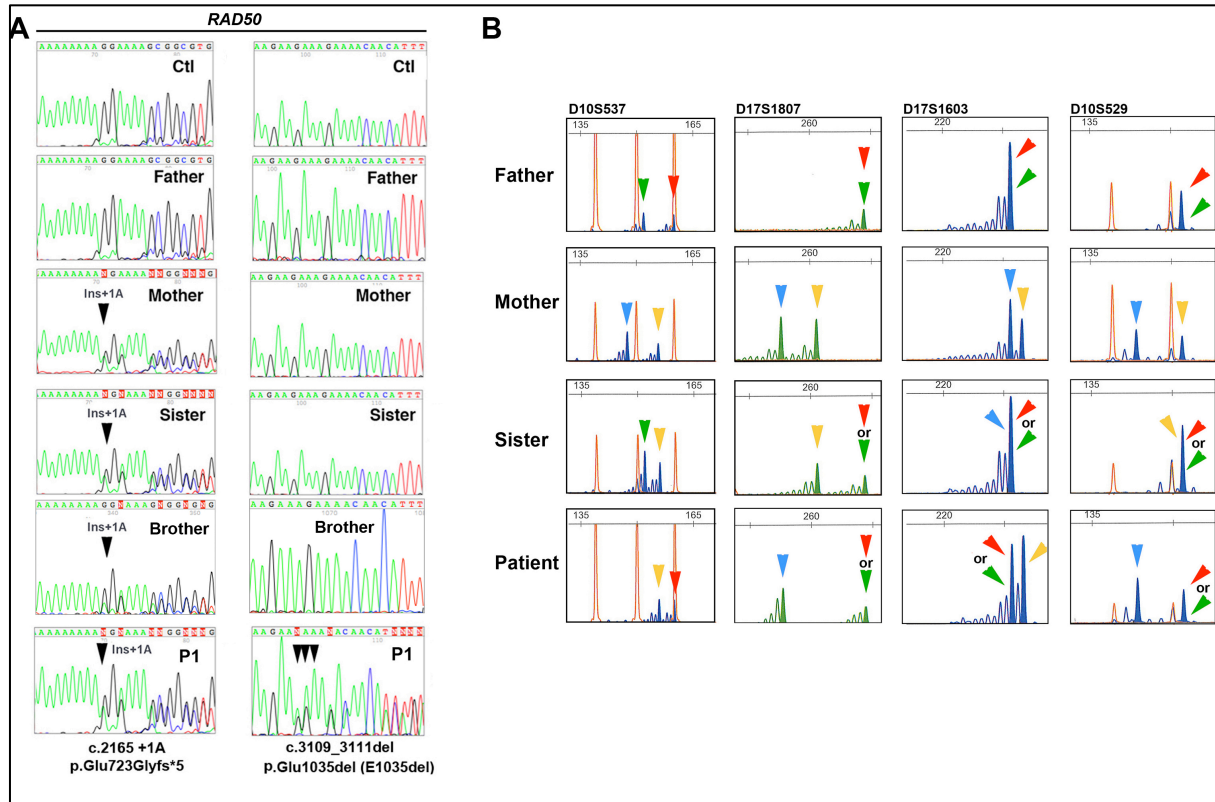


Figure S2. Segregation of RAD50 mutations in P1's family, related to Figure 1. (A) Direct Sanger sequencing of the RAD50 gene in a control, the patient, his parents, and his healthy brother and sister. Sequencing was performed on DNA extracted from blood samples. Arrows indicate the position of the mutations. **(B)** Genetic study of the linkage patient's family. Four microsatellite repeats were amplified with fluorescently labeled primers. Then the alleles from each subject in the family were separated by size, and the marker was tested for linkage with another. The raw family data are represented. Colored arrows represent the different alleles demonstrating the paternity of the father.

Figure S3

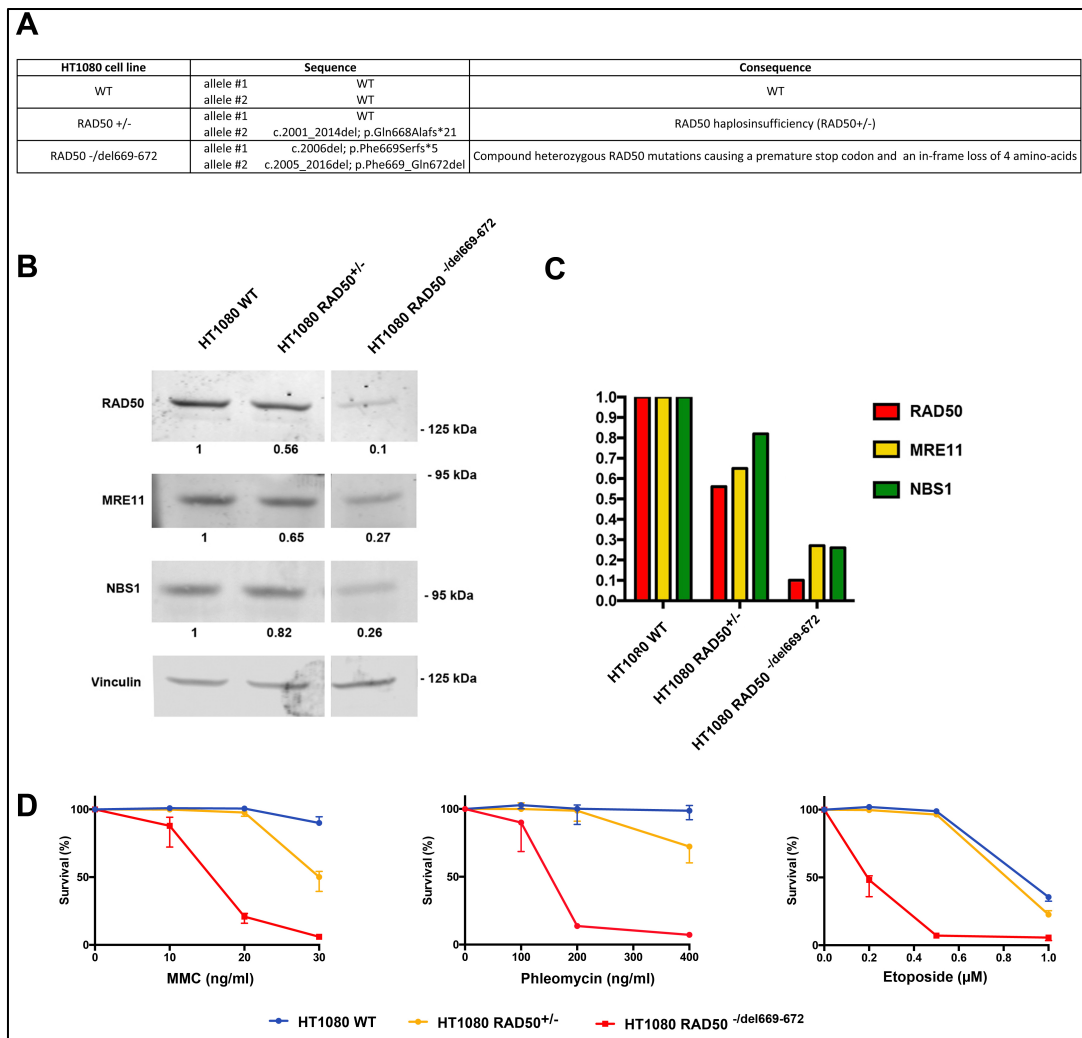


Figure S3. Generation and analysis of HT1080 cell lines mutated in RAD50 by CRISPR/Cas9, related to Figure 2. (A) Sequencing analysis indicated the genotype of WT and two HT1080 cell lines carrying RAD50 mutations either at a heterozygous state (RAD50^{+/-}) or compound heterozygous state (RAD50 compound heterozygous). The HT1080 RAD50^{+/-} cell line carried a wt RAD50 sequence on one allele and a deletion of 14bp in RAD50 gene on the other allele leading to a frameshift and a premature stop codon. This cell line was therefore haploinsufficient for RAD50. The other HT1080 cell line (noted RAD50^{-/del669-672}) carried an one base pair deletion on one allele leading to a frameshift and a premature stop codon and a deletion of 12 bp on the other allele causing the in frame loss of 4 amino acids at position 669-672. **(B)** Western blot analysis of RAD50, NBS1, and MRE11 in WT, RAD50^{+/-} and RAD50^{-/del669-672} HT1080 cell line. Vinculin immunoblot is used as loading control. Survival of the HT1080 cell lines after MMC treatment. **(C)** Relative amount of RAD50, MRE11, and NBS1 as quantified from (B). **(D)** Survival of the HT1080 cell lines after MMC treatment (left), Phleomycin treatment (middle) and Etoposide (right). Results indicated that RAD50^{-/del669-672} exhibited a strong DNA repair defect while RAD50^{+/-} was slightly defective only at the higher doses of genotoxics, demonstrating that RAD50 haploinsufficiency has only a minor effect on DNA repair in these settings.

Figure S4

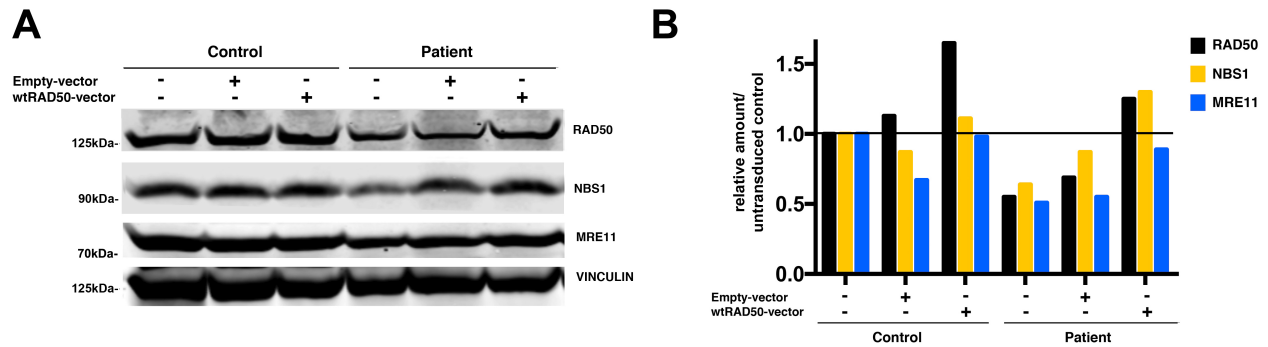


Figure S4. Ectopic expression of wtRAD50 in P1's cells, related to Figure 2. (A) Western blot analysis of RAD50, NBS1, and MRE11 in control and P1's SV40-transformed fibroblasts before and after transduction with wtRAD50 or empty vector. Vinculin immunoblot is used as loading control. **(B)** Relative amount of RAD50, MRE11, and NBS1 as quantified from (A). Protein levels were normalized to untransduced control.

Figure S5

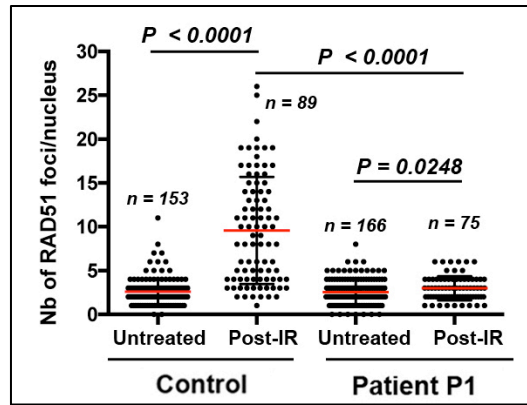


Figure S5. Quantitative analysis of RAD51 foci before and 6 hours after IR in primary fibroblasts from a healthy donor and patient P1, related to Figure 3. The number of nuclei scored and statistical significances are noted (Mann-Whitney).

Figure S6

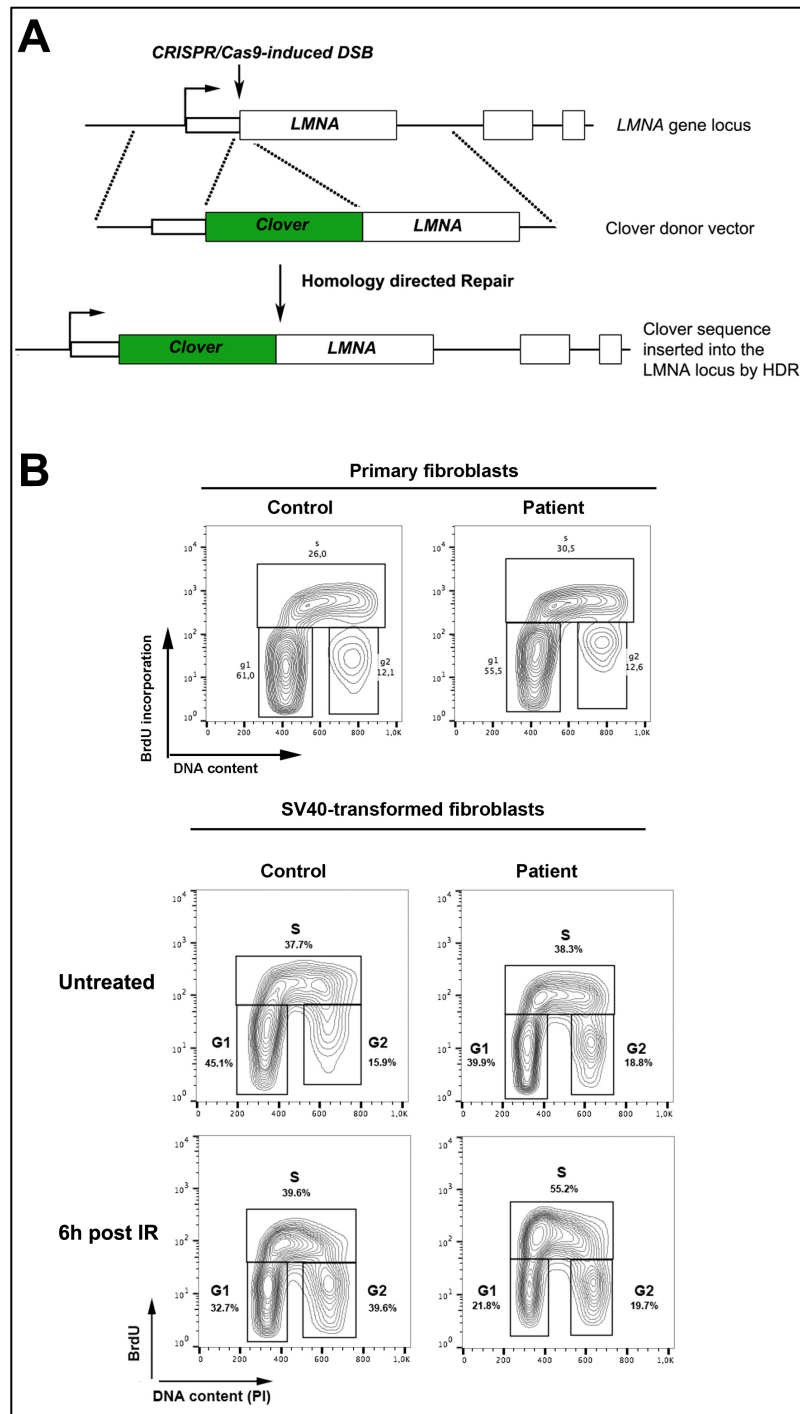


Figure S6. Principle of HDR assay and cell cycle analysis, related to Figure 3. (A) Schematic representation of the CRISPR-Cas9-induced integration of Clover into the *LMNA* locus. **(B)** Cell cycle analysis in primary and in untreated and 6 hours post-IR SV40-transformed fibroblasts from a control and patient P1. 1 hour BrdU incorporation and DNA content were determined by FACS analysis in primary and SV40-transformed fibroblasts from a healthy control and the patient P1. The percentages of replicating cells (in S phase) are noted

Figure S7

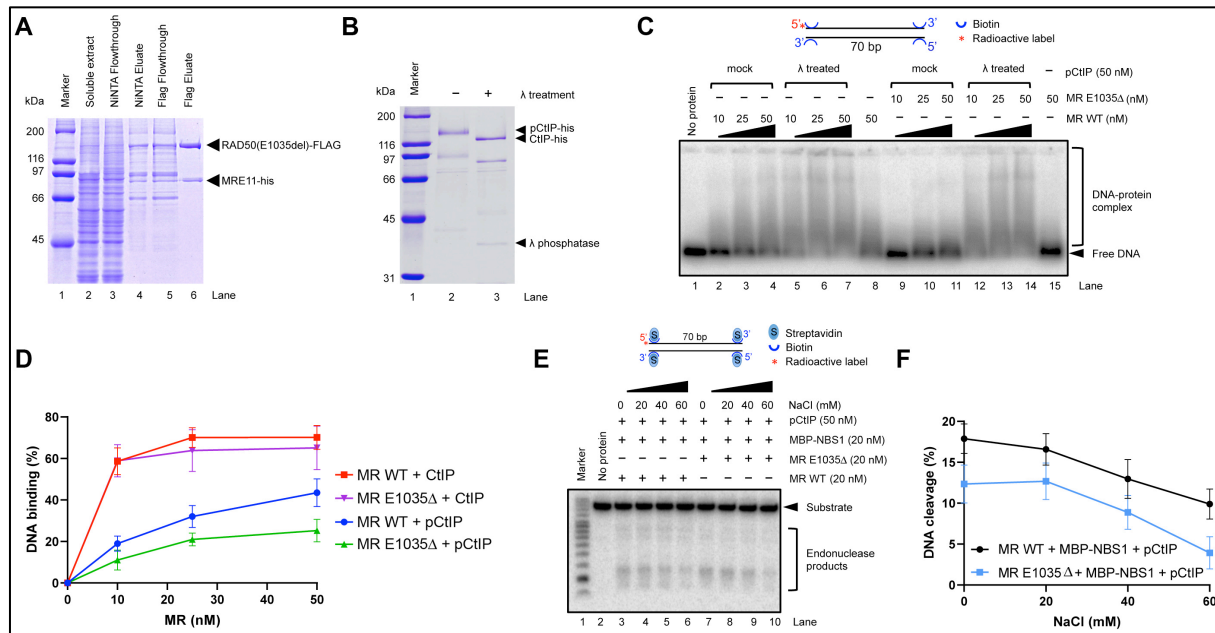


Figure S7. Purification of MRE11-his and RAD50 E0135 Δ -FLAG and DNA binding activity, related to Figure 5. (A) A 6% polyacrylamide gel stained with Coomassie blue showing fractions from a representative purification of MRE11-his and RAD50 E0135 Δ -FLAG. **(B)** Electrophoretic mobility of pCtIP either not-treated (lane 2) or treated (lane 3) with 1 phosphatase detected in polyacrylamide gel stained by Coomassie blue. **(C)** Binding of MR WT et MR E1035 Δ and phosphorylated or nonphosphorylated CtIP to dsDNA. **(D)** The quantitation represents an average from two independent experiments; the products above the blue arrow were scored as protein-bound DNA species. **(E)** Quantitation of experiments shown in **(C)**. Error bars, SEM; n=3. **(E)** Representative nuclease assay in function of NaCl concentration with MR WT or MR E1035 Δ in presence of MBP-NBS1 and pCtIP on 5'-end-labeled 70-bp dsDNA with all ends blocked with streptavidin. **(F)** Quantitation of experiments shown in **(E)**. Error bars, SEM; n=3.

Figure S8

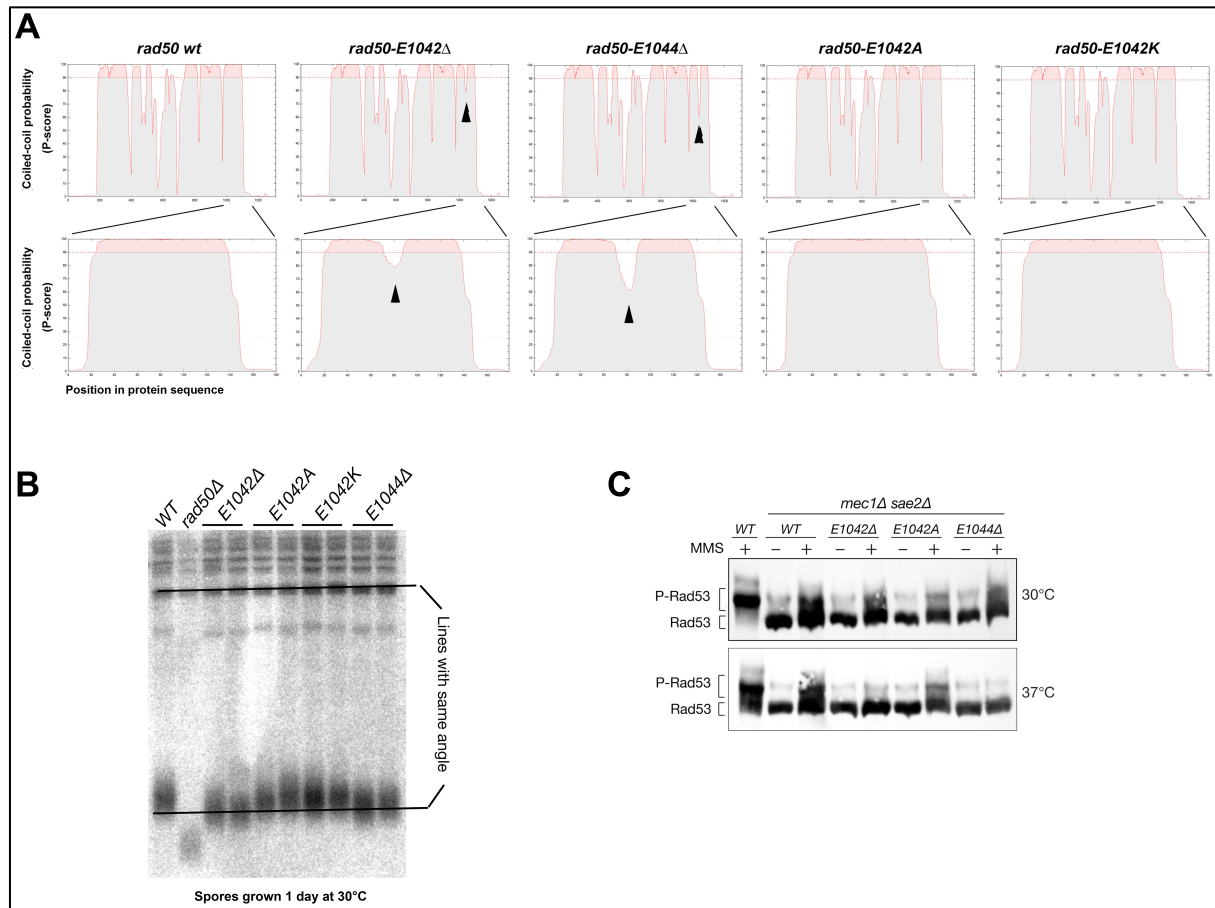


Figure S8. Coiled-coil probability and Tel1 function in the *rad50* mutants, related to Figure 6. (A) (Up) Representative view of the coiled-coil probability along the WT and the *Rad50* mutant sequences determined by Marcoil tool. The red area corresponds to the probable coiled-coil regions. (Down). Zoom of the region encompassing the mutations leading to a break in the coiled-coil probability in the *rad50-E1042D* and *rad50-E1044D* deletion mutants (black arrows) but not *rad50-E1042A* and *rad50-E1042K* missense mutants. **(B)** Telomere lengths of wild-type (WT) and *rad50* mutants after 1 day of growth at 30°C. **(C)** Tel1-dependent *Rad53* phosphorylation, as inferred from the appearance of a slower-migrating phosphorylated form, was assessed by western blotting in *Mec1-Sae2-* double mutants upon MMS treatment at 30°C and 37°C. The migration levels of the nonphosphorylated form (*Rad53*) and phosphorylated form (P-*Rad53*) are indicated. *Rad50* genotypes are given above.

MATERIELS ET METHODES

Certaines expériences menées durant la thèse n'ont pu trouver leur place dans l'article soumis et inséré ci-dessus. La section « Matériels et Méthodes » développée ici décrit ces dernières.

I : Etude de l'instabilité chromosomique dans les cellules du patient

Métaphases

10⁵ fibroblastes transformés par l'antigène grand T du virus SV40 sont traités 1h30 à 37°C avec 0,03 µg/mL de colcemid. Les cellules sont récoltées et centrifugées (5 min, 150 g) avant de subir un choc hypotonique avec l'ajout de 4 ml en goutte à goutte d'une solution contenant 0,0075 M de KCl tout en mélangeant à faible vitesse à l'aide d'un vortex. Les cellules sont incubées 2 min à 37°C puis fixées dans un mélange méthanol-acide acétique (3 :1) déposé au goutte à goutte sans agitation. Les cellules sont ensuite centrifugées 7 min à 150 g. Après aspiration du surnageant, le culot est resuspendu par tapotement au doigt et 10 ml de fixateur sont ajoutés (goutte à goutte en mélangeant à faible vitesse). Les cellules sont centrifugées 5 min à 150 g, le culot, resuspendu par tapotement au doigt, est repris dans 500 µL de fixateur (méthanol-acide acétique (3 :1)). Les métaphases sont étalées par éclatement des cellules sur une lame et marquées au DAPI. Les lames sont observées sur un microscope à fluorescence Zeiss Axioplan. Les images sont acquises via une caméra CCD CoolSnap (Photometrics) et sont analysées avec le logiciel ImageJ.

II : Etude de la réparation dans les cellules du patient

II.1 Western Blot FANCD2

Les cellules sont traitées avec la mitomycine C (150 ng/mL, 24h) avant d'être lysées 20 min sur glace dans un tampon de lyse contenant 50 mM Tris (pH8), 2 mM EDTA, 1% Triton X-100, 1% de cocktail d'inhibiteur de phosphatase (Sigma) et des inhibiteurs de protéase (Roche). Les protéines du surnageant post centrifugation (15 min, 4°C, 15 000 rpm) sont quantifiées par méthode de Bradford. Après séparation par migration dans un gel SDS-PAGE, les protéines sont transférées sur une membrane PVDF Immobilon-P (Millipore). La membrane est incubée 1h dans du blocking buffer Odyssey (TBS) avant incubation avec l'anticorps anti FANCD2 (sc-20022 dilué au 1/500, 2h), lavage puis incubation avec l'anticorps secondaire anti IgG de souris (Li-Cor IRdye 800CW Infrared Dye, dilution au 1/10 000). La présence des protéines est détectée par fluorescence infrarouge selon les recommandations du fabricant (Odyssey CLx Imaging System). La membrane a été incubée avec un anticorps anti STAT3 (Santa Cruz, sc-8019, 1/1 000) comme contrôle de charge.

II.2 Foci 53BP1 post phléomycine

24h avant marquage, 10 000 fibroblastes primaires sont déposés sur une lamelle (12 mm de diamètre) placée dans une plaque 24 puits contenant du milieu de culture. Les cellules sont traitées 1h30 avec 400 ng/mL de phléomycine puis 1h ou 24h après, fixées en PFA 4%, 15 min à température ambiante (TA). 3 lavages au PBS 1X successifs sont menés avant que les cellules ne soient perméabilisées 30 min à TA dans une solution de PBS 1X, BSA 1%, 1 mM EDTA, 1% Triton X100. 3 lavages successifs de 5 min en PBS 1X, BSA 1% précèdent le marquage avec l'anticorps primaire anti 53BP1 (Novus NB100-304, 1/200 dans PBS 1X BSA 1%, 30 min, TA). L'anticorps secondaire Alexa 488 anti IgG de lapin est ensuite appliqué (Invitrogen A288175, 1/1000 dans PBS 1X, BSA 1%, 30 min, TA) après 3 nouveaux lavages (3x5 min, PBS 1X, BSA 1%). Les noyaux sont marqués au DAPI (1/1000 dans PBS 1X, 5 min). Les lamelles sont montées avec du fluorsave et observées sur un microscope à fluorescence Zeiss Axioplan. Les images sont acquises via une caméra CCD CoolSnap (Photometrics) et sont analysées avec le logiciel ImageJ.

II.3 Test de la voie NHEJ

3 µg de plasmide pREPµ préalablement digéré (coupure blunt-blunt avec microhomologie proche) (Figure 25) sont transfectés par électroporation (Biorad, 250V, 1050 µF, R_{∞}) dans 10^5 fibroblastes transformés par l'antigène grand T du virus SV40. Après 48h, une minilyse alcaline (HIRT) permet d'extraire les plasmides des cellules. Pour ce faire, 100 µL d'une solution I froide (50 mM glucose, 10 mM EDTA, 25 mM Tris-HCl pH8) puis 200 µL de 0,2 N NaOH, 1% SDS sont déposés sur les culots cellulaires et laissés 10 min sur glace. 150 µL de solution III froide (3M NaOAc pH4,85) sont ajoutés avant une incubation de 1h sur glace. 400 µL de surnageant obtenu après centrifugation (30 min, 1500 rpm, 4°C) sont récoltés auxquels 1 mL d'éthanol froid est ajouté. Après 20 min à -80°C et centrifugation (15 min, 15 000 rpm, 4°C), les culots sont repris dans 100 µL de solution IV froide (100 mM NaOAc pH7, 50 mM Tris-HCl pH8), auxquels sont ajoutés 200 µL d'éthanol 100% froid. Après 20 min à -80°C et centrifugation (15 min, 15 000 rpm, 4°C), les culots sont lavés en éthanol 70% froid, séchés puis resuspendus dans de l'eau. Une PCR barre codée permet d'amplifier les régions de religation des plasmides ainsi extraits. Ces PCR sont séquencées à haut débit sur un séquenceur Illumina. Les séquences sont analysées sur Seaview.

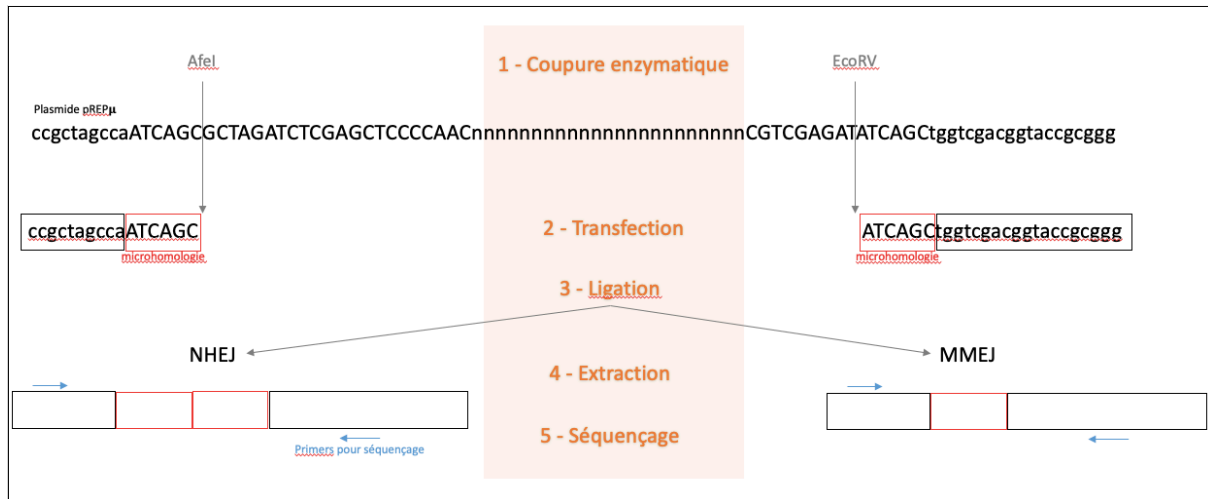


Figure 25 : Test de la voie NHEJ. Une fois digéré avec le couple d'enzyme AfeI/EcoRV, le plasmide pREPμ expose des séquences microhomologues de 6 pb (boîtes rouges) qui pourront servir de support à sa recircularisation par les acteurs du NHEJ ou du MMEJ. Les plasmides ainsi reliés par la cellule sont extraits par minilyse alcaline et le point de jonction est séquencé.

II.4 Analyse PROMIDISα

Le répertoire du TCRα a été analysé par l'utilisation de la technique PROMIDISα (**Berland et al., 2019, JACI**). Brièvement, les ADN complémentaires extraits de cellules mononuclées issues de sang récolté sur EDTA ont été amplifiés dans une PCR multiplexe avec des paires d'amorces spécifiques pour les segments proximaux, médians et distaux de la partie variable du gène codant le récepteur α des lymphocytes T (TRAV) associés à leur segment J proximal ou distal (TRAJ) (Figure 26). Après RT-PCR et séquençage à haut débit (NGS), les clonotypes composés de différentes combinaisons TRAVJ proximales ou distales exprimées par le TCRα ont été scorés avec LymAnalyser. Une analyse en composante principale permet d'établir une représentation de la corrélation entre l'utilisation relative des TRAV et des TRAJ.

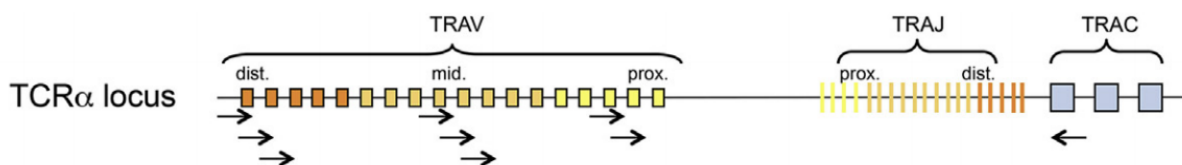


Figure 26 : Analyses du TCRα par la technique de PROMIDISα. Les amorces utilisées pour l'amplification par PCR du locus du TCRα permettent de déterminer l'utilisation des segments V et la fréquence des segments J du gène au sein des différents clonotypes.

II.5 SMART

50 000 fibroblastes transformés par l'antigène grand T du virus SV40 sont irradiés (5 Gy, rayons X) ou non puis incubés 2h à 37°C. Les cellules sont reprises dans 45 µL PBS 1X auxquels sont ajoutés 45 µL d'agarose low melt 1,2% fondu. Les plugs contenant les cellules sont moulés en barrettes (Disposable Plug Mold – Biorad) durant 1h à 4°C puis glissés dans une solution contenant 200 µL d'EDTA (0,5M), 25 µL de Sarkozyl NL 10% et 50 µL de protéinase K (20 mg/mL) durant 16h à 50°C. Les plugs sont ensuite lavés 3x1h puis 1x3h sur roue en TE10.1 avant d'être placés dans 1 mL de MES 0,5M pH5,5 préparé extemporanément. Ils sont incubés 20 min à 68°C puis 10 min à 42°C avant d'être digérés par ajout de 1,5 µL de bêta-agarase durant 16h à 42°C. Les solutions d'ADN obtenues sont transvasées en réservoir puis peignées au moyen du FiberComb® (Genomic Vision). Les lamelles peignées sont séchées (2h, 60°C) puis marquées 2h à 37°C en chambre humide avec un anticorps primaire dirigé contre l'ADN simple brin (DSHB autoanti-ssDNA-s au 1/25 dans du blockAid Invitrogen B10710). Les lamelles sont ensuite lavées dans trois bains successifs de 2 minutes de PBS-Tween 0,05% avant d'être marquées 1h à 37°C en chambre humide avec un anticorps secondaire anti IgG de souris Alexa 546 (Invitrogen A-11030) dilué au 1/1000 dans 25 µL de blockAid. Après un nouveau cycle de lavage les lamelles sont plongées 30 sec dans une solution de yoyo (Invitrogen Y3601) dilué au 1/10 000 dans du blockaid puis rincées dans un bain d'eau. Les lamelles sont finalement déshydratées par plongeon dans trois bains successifs d'une minute en éthanol 70%, 90% et 100%, séchées puis observées sur un microscope à fluorescence Zeiss Axioplan. Les images sont acquises via une caméra CCD CoolSnap (Photometrics) et sont analysées avec le logiciel ImageJ.

II.6 Immunofluorescence Ku80

10 000 fibroblastes transformés par l'antigène grand T du virus SV40 déposés sur une lamelle sont traités à la camptothécine (1µM, 1h) puis lavées 2x5 min dans du PBS 1X. Une pré-extraction (2x3min) dans du tampon CSK (10mM PIPES pH7, 100 mM NaCl, 300 mM sucrose, 3 mM MgCl₂, 0,7% Triton X100, 0,3 mg/ml RNase A) est réalisée à TA. Après 3 lavages de 5 min dans du PBS 1X, les cellules sont fixées (PFA 2% dans PBS 1X, 15 min, TA) puis lavées (2x5 min, PBS 1X). Les cellules sont ensuite perméabilisées (PBS 0,2% Triton X100, 5 minutes), lavées (3x5 min, PBS 1X) et bloquées (PBS 0,1% Tween, 5% BSA, 10min) avant marquage avec l'anticorps primaire anti KU80 (Thermo Fischer Invitrogen MA5-12933) au 1/200 dans du PBS 1X 0,1% Tween 5% BSA, 1h en chambre humide à 37°C. Les lamelles sont ensuite lavées (3x5 min dans PBS 1X, 0,1% Tween) puis marquées avec l'anticorps secondaire Alexa 488 anti IgG de souris au 1/1000 dans du PBS 1X 0,1 % Tween 5% BSA pendant 45 min à 37°C en chambre humide. Finalement, les lamelles sont lavées 3x5 min dans du PBS 1X 0,1% Tween puis 1x5 min dans du PBS 1X avant marquage au DAPI. Les lamelles sont montées en fluorsave puis observées au moyen d'un microscope confocal SP8-gSTED. Les images obtenues sont déconvoluées via le logiciel Huygens et analysées avec ImageJ.

III : Génération de souris $Rad50^{E1035\Delta}$

Par la technologie du CRISPR/cas9 des lignées murines ont été établies portant soit la mutation $Rad50^{E1035\Delta}$ soit une mutation nulle par insertion/délétion afin de générer un allèle KO. Les deux lignées murines, après croisements permettront de générer une lignée de souris récapitulant le génotype du patient $Rad50^{E1035\Delta/-}$. Toutes les procédures de génération du modèle animal ont été réalisées au sein de la plateforme de transgénèse de l'Institut Imagine, par Pierre David, avec l'approbation du ministère de l'enseignement supérieur, de la recherche et de l'innovation et du comité éthique de l'Université de Paris.

Le mix CRISPR à injecter (1,5 μ M de protéine Cas9, 1,5 à 2,25 μ M d'ARN guide et 100 ng/ μ L de matrice) est directement administré par micro-injection dans des zygotes prélevés chez des femelles superovulées puis fécondés de la lignée murine sauvage C57BL/6J. Après action du système CRISPR/Cas9 les zygotes survivants sont placés en milieu de culture (KSOM) durant une nuit afin d'atteindre le stade deux cellules. Les embryons peuvent ensuite être transférés selon les procédures chirurgicales standards chez une femelle préparée à les recevoir. La présence des allèles mutés dans la descendance est déterminée par PCR et séquençage.

Deux lignées mutées dans $rad50$ ont ainsi été générées (Figure 27) :

- Une lignée hétérozygote Knock-Out (wt/KO) grâce à l'utilisation du CRISPR/Cas9 et d'un guide ARN dirigé contre l'exon 6 ($Rad50$),
- Une lignée hétérozygote Knock-In (wt/KI) dans laquelle l'acide glutamique de l'exon 20 en position 1035 a été délété grâce à un guide ciblant le locus d'intérêt et d'une matrice portant la séquence mutée ($Rad50^{E1035\Delta}$).



Figure 27 : Exons ciblés pour la génération du modèle murin $Rad50^{E1035\Delta/-}$. Deux guides ont été définis pour obtenir par la technologie du CRISPR deux lignées murines qui une fois accouplées entre elles permettront d'obtenir des animaux de génotype $Rad50^{E1035\Delta/-}$. Les mutations silencieuses ajoutées autour de la délétion E1035 permettent d'empêcher les coupures successives du CRISPR/cas9 et les potentiels événements de re-recombinaison ou de mutagenèse dans la matrice intégrée au génome.

Les accouplements contrôlés entre ces deux lignées permettent d'obtenir une descendance avec des souriceaux au génotype KI/KO ($RAD50^{E1035\Delta/-}$) identique à celui du patient étudié. Ces souris permettent notamment d'analyser le développement du système immunitaire dans ce contexte génétique.

Pour ce faire, les rates et thymus sont récoltés et écrasés dans du PBS 1X 1% SVF froid. Les têtes fémorales sont coupées et les os sont centrifugés à vitesse maximale pendant quelques secondes dans du PBS 1X 1% SVF froid afin d'en extraire la moelle. Toutes les cellules ainsi

extraites sont centrifugées 5 minutes à 1500 rpm puis reprises dans 10 ml de PBS 1X 1% SVF avant d'être comptées. 1 million de cellules sont marquées dans 100 µL d'un cocktail d'anticorps adapté (Rate, marquage B et T : anticorps anti B220, anti IgM, anti CD4, CD8 et CD3. Rate, marquage NK : anticorps anti TCR, NK1.1, CD19 et anti GR1. Thymus : anticorps anti CD4, CD8, CD44, CD25 et CD28. Moelle : anticorps anti IgM, B220, CD43 et CD19). Après une incubation de 30 minutes à 4°C, les cellules sont lavées, resuspendues dans 150 µL de PBS et 150 µL de cytox (au 1/1000^{ème}) puis analysées sur un FACSCanto II (BD) ou sur un FACS spectral SA3800 (SONY).

RESULTATS

La totalité des expériences menées durant ces quatre années de thèse n'a pu être reportée dans l'article soumis. Ainsi, les résultats complémentaires sont détaillés ci-après. De plus, un modèle murin est en cours d'analyse et les résultats préliminaires sont présentés ci-dessous.

I : Etude de l'instabilité chromosomique dans les cellules du patient

L'analyse des métaphases dans les cellules du patient montre une augmentation spontanée significative de structures anormales (chromosomes radiaux, fusionnés et cassés) comparée aux cellules contrôle (Figure 28) évoquant une instabilité génomique.

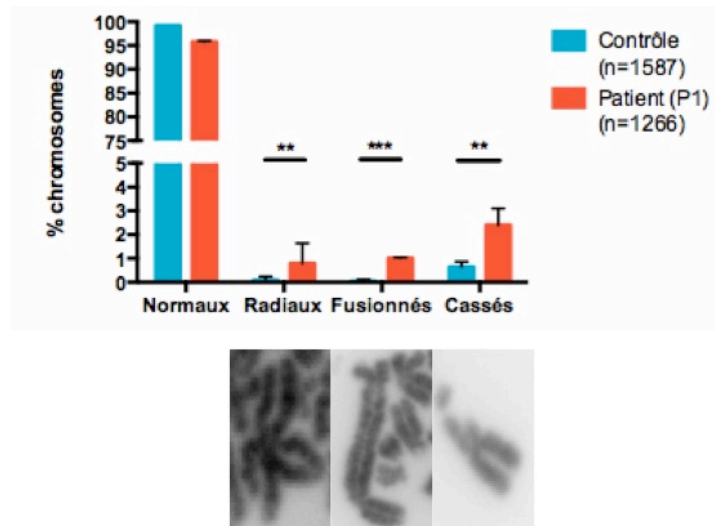


Figure 28 : Analyses de métaphases dans les cellules du patient P1. Spontanément, les chromosomes des cellules du patient adoptent des structures aberrantes et présentent des signes d'instabilité.

II : Etude de la réparation dans les cellules du patient

II.1 Ubiquitination de FANCD2

Comme présenté dans l'article, les systèmes de réparation ont été analysés dans les cellules du patient et une sensibilité à la mitomycine C (MMC) a été observée. La MMC est un agent créant des ponts inter brins qui, lors de la réplication, induisent des cassures double brin. Les lésions induites par la MMC sont prises en charge par la voie de Fanconi qui implique

l'ubiquitination de FANCD2 lors de la détection de dommages à l'ADN. Dans les cellules du patient, cette ubiquitination de FANCD2 est détectée (Figure 29) excluant que la sensibilité à la MMC soit liée à un défaut des étapes de la voie de Fanconi nécessaire à cette ubiquitination.

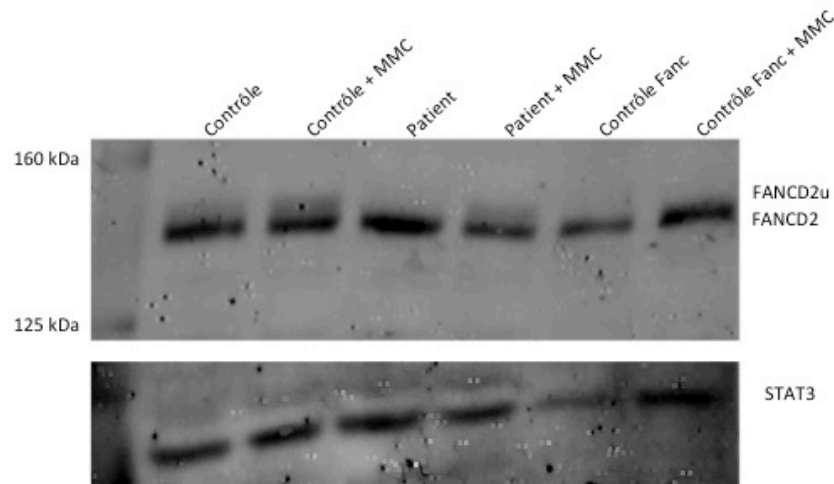


Figure 29 : Western Blot FANCD2. Après traitement à la MMC, FANCD2 ubiquitinée est détectée dans les cellules du patient. Contrôle de charge : STAT3.

II.2 Analyse des foyers 53BP1 induits par la phléomycine

Les cellules du patient montrent des foyers 53BP1 spontanés (Figure 30) dont la présence a été confirmée par une analyse à plus grande échelle au moyen d'une détection et d'un comptage automatisés. Ceci évoque un stress répliatif dans les cellules du patient. Après induction de dommages à l'ADN avec la phléomycine, le recrutement de 53BP1 est néanmoins observé avec une augmentation significative du nombre de foyers 53BP1. Toutefois, 24h après traitement, on observe une rétention de foyers 53BP1 dans les cellules du patient, s'accumulant à un niveau supérieur à celui observé dans la condition non traitée. Ce résultat confirme que la mutation de RAD50 ne compromet pas la détection des CDBs et l'activation de la DDR (ici matérialisée par le recrutement de 53BP1) mais affecte la réparation de ces dommages.

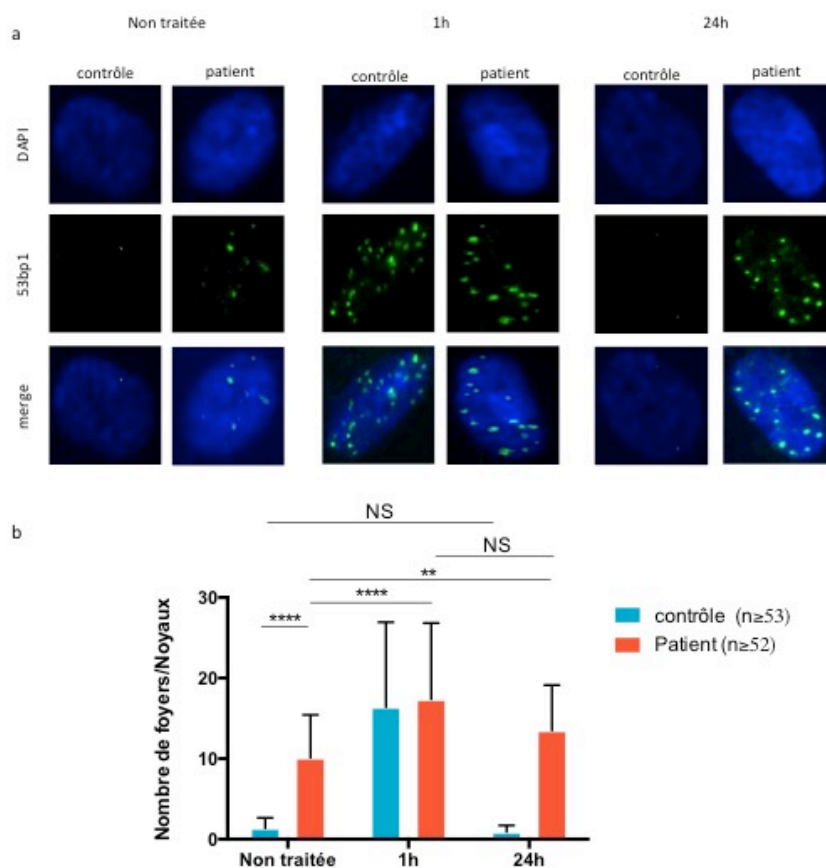


Figure 30 : Analyse des foyers 53BP1 dans les cellules du patient avant et après traitement à la phléomycine. a) Immunofluorescence 53BP1 et b) dénombrement.

II.3 Analyse de la religation de plasmides linéarisés

Afin de déterminer si une voie de réparation des cassures double brin (MMEJ vs NHEJ) est privilégiée par rapport à une autre dans les cellules du patient, des plasmides coupés par digestion enzymatique ont été introduits dans les cellules de contrôle et du patient. Les coupures génèrent des plasmides linéarisés dont les extrémités double brin présentent des séquences de microhomologie (6 pb) rapprochée disponibles. Après réparation les plasmides recircularisés sont isolés puis la séquence au point de ligation est déterminée. Les résultats obtenus par cette approche ont dans un premier temps suggéré une réduction de la fréquence du MMEJ dans les cellules du patient (Figure 31). En effet, bien que l'utilisation du NHEJ semble similaire entre les cellules contrôle et celles du patient, 7% des séquences analysées correspondent à une réparation par MMEJ dans les cellules contrôle alors qu'il n'est que de 3% dans les cellules du patient. Ce résultat évoque un biais d'utilisation du MMEJ chez le patient qui pourrait être lié à un défaut d'activité du complexe MRN au cours de ce processus.

En effet, l'étape de résection portée par MRE11 oriente la voie de réparation engagée en permettant le MMEJ, laissant penser que l'activité nucléasique du complexe MRN est perturbée par la mutation RAD50^{E1035Δ}.

Cependant, une très grande variabilité dans les résultats suivants a été observée ce qui n'a pas permis de dresser des conclusions définitives sur ces expériences.

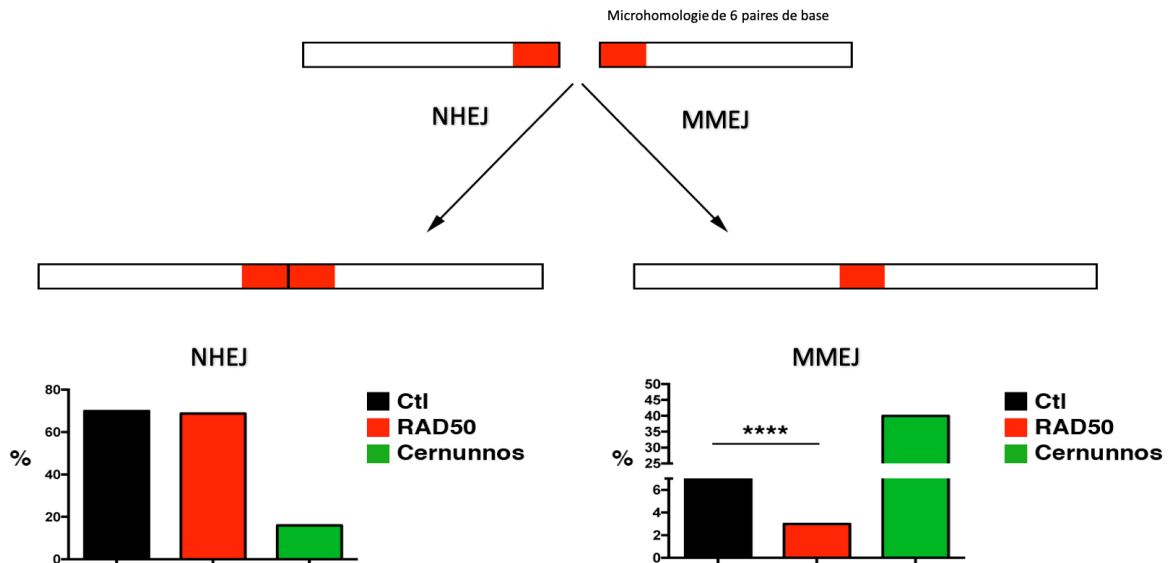


Figure 31 : Utilisation du NHEJ et du MMEJ pour la réparation de plasmides coupés. Nombre de séquences analysées par condition > 540 000. La protéine Cernunnos (également appelée XRCC4-like factor (XLF)) est impliquée dans le NHEJ en interagissant avec DNA ligase IV et XRCC4. Cernunnos stimule l'activité de ligation de Ligase IV et forme avec XRCC4 un filament de fixation à l'ADN pouvant participer à l'alignement des extrémités cassées (**Buck et al., 2006, Cell**). Un biais d'utilisation du NHEJ dans les cellules mutées dans Cernunnos est observé au profit du MMEJ. Ces cellules sont utilisées comme contrôle positif de l'expérience.

II.4 Analyse du répertoire TCR α par PROMIDIS α

La signalisation des dommages de l'ADN est assurée par MRN via le recrutement d'ATM. Dans les cellules du patient, les principales cibles d'ATM semblent être activées ne suggérant pas de défaut d'ATM. Afin d'analyser un autre processus dépendant d'ATM, le locus du gène codant le récepteur alpha des lymphocytes T (TCR α) du patient a été analysé par la technique du PROMIDIS α (**Berland et al., 2019, JACI**). Cette méthode met en évidence une signature unique du TCR α dans les cellules de patients déficients en ATM. L'analyse PROMIDIS α des

lymphocytes T du patient (réalisée par JP de Villartay) montre un répertoire proche de ceux retrouvés chez des patients présentant un défaut dans un facteur impliqué dans la recombinaison V(D)J (Cernunnos, Artemis, RAG1, RAG2, DNA ligase 4, DNAPK-cs) et distinct de celui de patients ATM (Figure 32). Ce résultat conforte in vivo la notion que la mutation $RAD50^{E1035\Delta}$ ne perturbe pas les voies de signalisation dépendantes d'ATM.

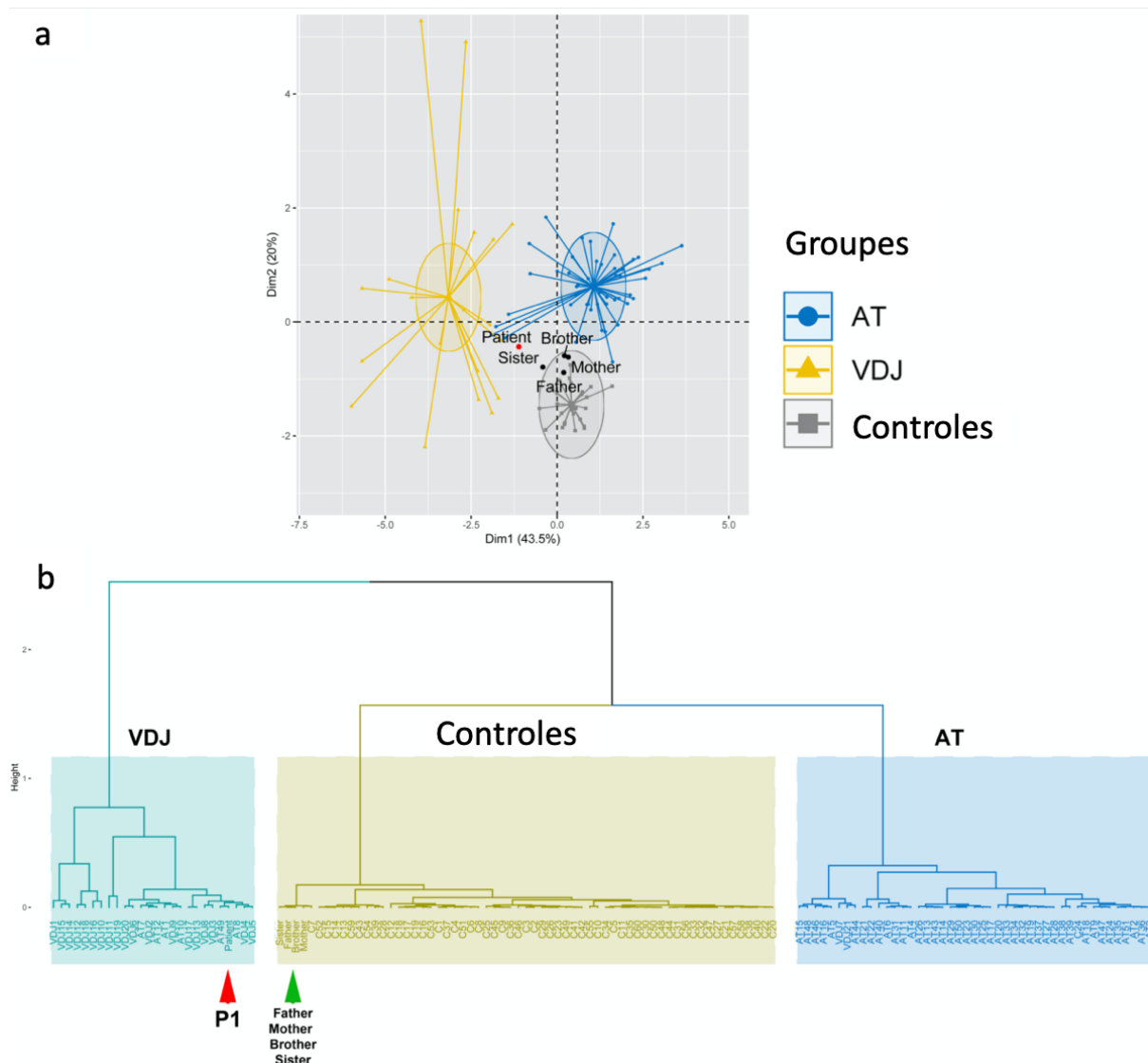


Figure 32 : Analyse PROMIDIS α du TCR α . a) Analyse du TCR α en composante principale. Groupe AT : patients déficients en ATM. Groupe VDJ : patients déficients pour un facteur de la recombinaison V(D)J (Cernunnos, Artemis, RAG1, RAG2, DNA ligase 4, DNAPK-cs). b) Clusterisation des groupes contrôles et AT.

II.5 Analyse de la génération d'ADN simple brin par la technique du SMART

La méthode du SMART a été utilisée afin d'estimer la résection après cassure double brin induite par irradiation (cf. Introduction) en marquant l'ADN simple brin avec un anticorps spécifique. Le contre marquage de l'ADN double brin est assuré par le marqueur fluorescent yoyo.

La technique a été dans un premier temps testée en utilisant des lignées T Jurkat contrôle et des 53BP1 KO générés au laboratoire par l'utilisation de la technologie du CRISPR/cas9. En effet, après une cassure double brin, le recrutement de 53BP1 inhibe la RH en limitant l'étape de résection qui lui est indispensable. L'utilisation de cellules mutées dans 53BP1 permet de s'affranchir de cette inhibition en favorisant la génération d'ADN simple brin après induction de cassures double brin. Comme illustré dans la figure 33, dans les lignées contrôle, des fibres simple brin sont détectables avant irradiation. La longueur de ces fibres semble augmenter après irradiation. De plus, une augmentation importante de la longueur des fibres simple brin après irradiation dans les ADN des blastes 53BP1 KO est détectable. Néanmoins, l'anticorps anti simple brin est marqué en rouge et uniquement un signal jaune est observable, suggérant un marquage assez peu spécifique du yoyo pour l'ADN double brin. De plus, le signal observé est le plus fréquemment perlé, entraînant des difficultés dans la mesure du signal. Toutefois, ces résultats restent encourageants et l'expérience a été poursuivie sur des fibroblastes contrôle transformés par l'antigène grand T de SV40.

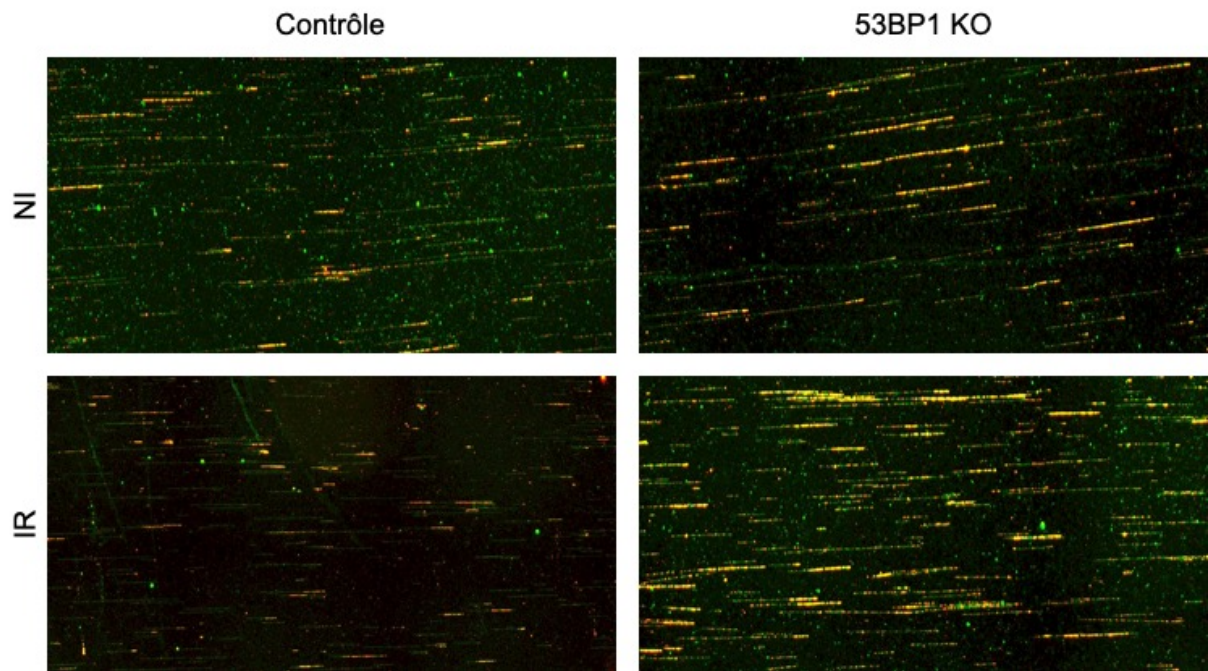


Figure 33 : SMART sur des lignées T Jurkat contrôle et 53BP1 KO. Les fibres d'ADN double brin sont marquées au yoyo (vert) tandis que l'ADN simple brin est révélé par l'utilisation d'un anticorps anti simple brin spécifique (rouge). NI : Condition non irradiée. IR : Condition irradiée.

Comme indiqué dans la figure 34, dans des fibroblastes transformées SV40 contrôle, à densité comparable de fibres, il ne semble pas y avoir de différence de marquage des fibres simple brin entre les conditions irradiée et non irradiée. Une mise au point plus poussée de la technique sera nécessaire afin de déterminer si des différences de production d'ADN simple brin post cassures peuvent être mises en évidence entre cellules contrôles et cellules du patient RAD50.

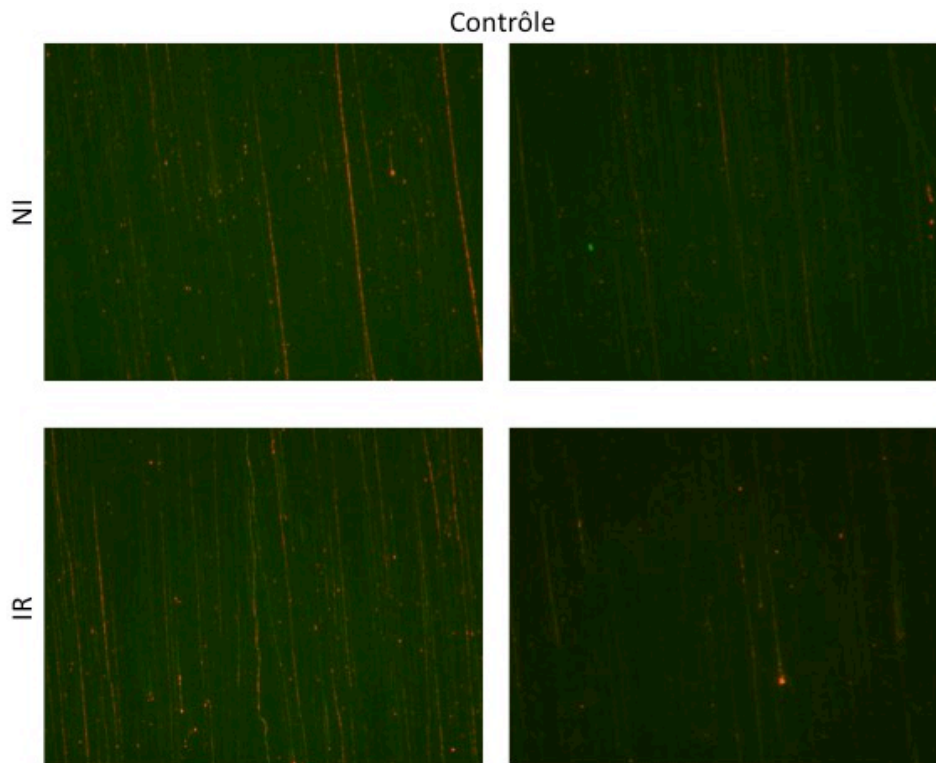


Figure 34 : SMART sur fibroblastes. Marquage des fibres simple brin (rouge) de l'ADN (vert) avant (condition non irradiée – NI) et après irradiation (IR).

II.6 Détection de foyers Ku aux extrémités d'ADN générées par la camptothécine

La camptothécine (CPT) est un inhibiteur sélectif de l'ADN topoisomérase I qui stabilise l'association de la protéine avec l'ADN. Durant la phase S la collision entre les fourches de réplication avançant et le complexe de la topoisomérase I fixé sur l'ADN entraîne des extrémités double brin (Liu *et al.*, 2000, *Ann N Y Acad Sci*). Après traitement à la CPT, Ku s'associe rapidement à l'extrémité double brin créée. Néanmoins, le NHEJ est un système de réparation approprié lorsque deux extrémités d'ADN sont présentes mais inadapté lorsqu'une fourche de réplication rencontre une lésion de l'ADN induite par la CPT, car une seule extrémité d'ADN est disponible. Dans ces circonstances Ku pourrait donc bloquer la RH, favorisant des ligations aberrantes pouvant aboutir à des réarrangements chromosomiques (Patel *et al.*, 2011, *Proc Natl Acad Sci USA*). Il a été démontré que Ku et le complexe MRN peuvent coexister à la même cassure. Le complexe MRN peut ensuite, en interaction avec CtIP et grâce à son activité nucléasique libérer Ku, l'empêchant ainsi de rester à l'extrémité double brin (Chanut *et al.*, 2016, *Nature Comm*). En cas d'inactivation de l'activité

exonucléasique de MRE11, Ku est retenue à l'extrémité double brin induite par la CPT et peut être détecté sous forme de foyers par immunofluorescence couplée à de la microscopie à haute résolution. Des expériences d'immunofluorescence marquant Ku80 après traitement à la CPT ont été menées sur les cellules du patient (Figure 35). Les résultats obtenus laissent visuellement penser qu'il y a dans les cellules du patient une rétention de foyers Ku80 post traitement à la CPT, contrairement aux cellules contrôle. Une déconvolution des images est indispensable pour pouvoir quantifier le signal. L'aire du noyau recouverte par le signal Ku80 a été mesurée mais les données ainsi analysées ne reflètent pas l'impression visuelle apportée par les images. D'autre part, un fort signal Ku80 est observable dans le cytoplasme des cellules et ce signal est amplifié après traitement à la CPT laissant planer des doutes sur la qualité de la pré-extraction et/ou sur la spécificité de l'anticorps utilisé. Bien qu'ayant tenté de réaliser une méthodologie très similaire à celle décrite par Chanut et collaborateurs (méthode d'extraction, anticorps), nous n'avons pas été en mesure d'obtenir des résultats satisfaisants permettant de déterminer si l'activité de MRE11 nécessaire à l'éviction de Ku80 des extrémités d'ADN générées par la CPT est anormale dans les cellules du patient.

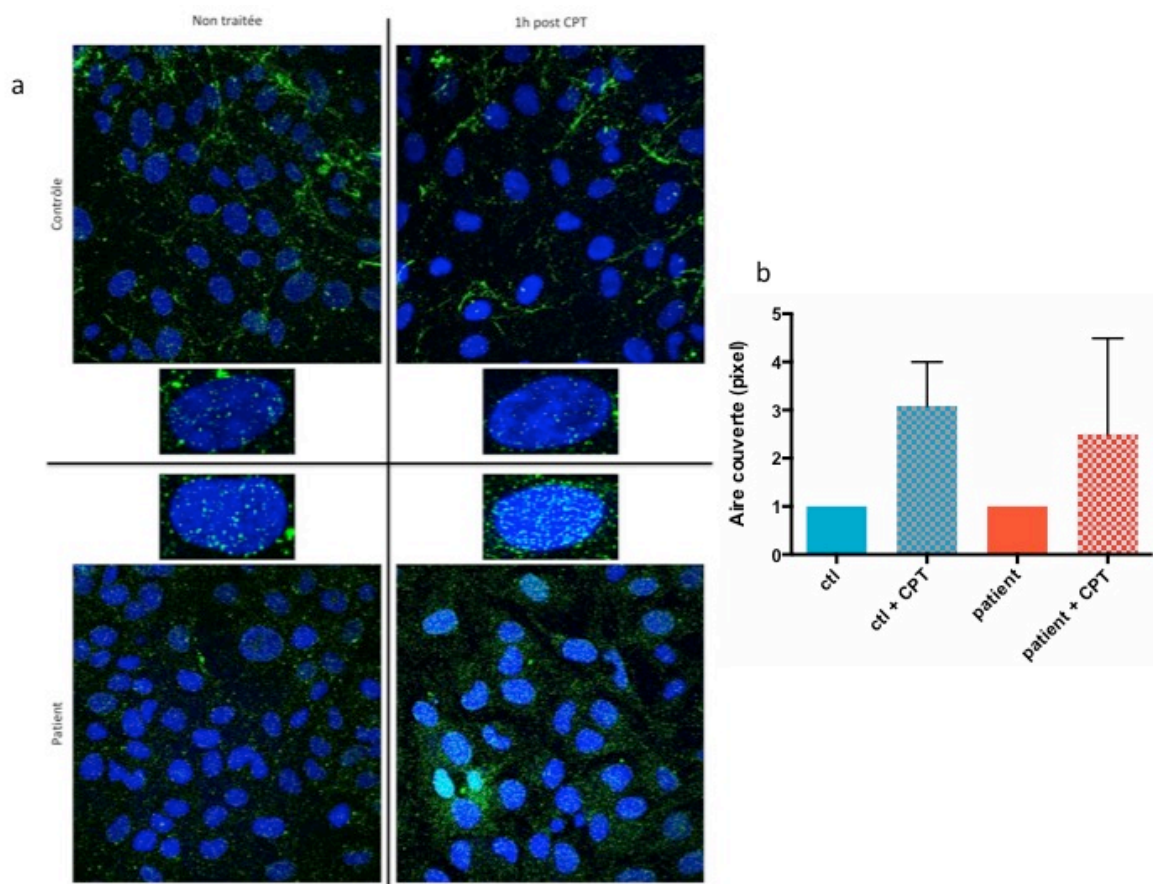
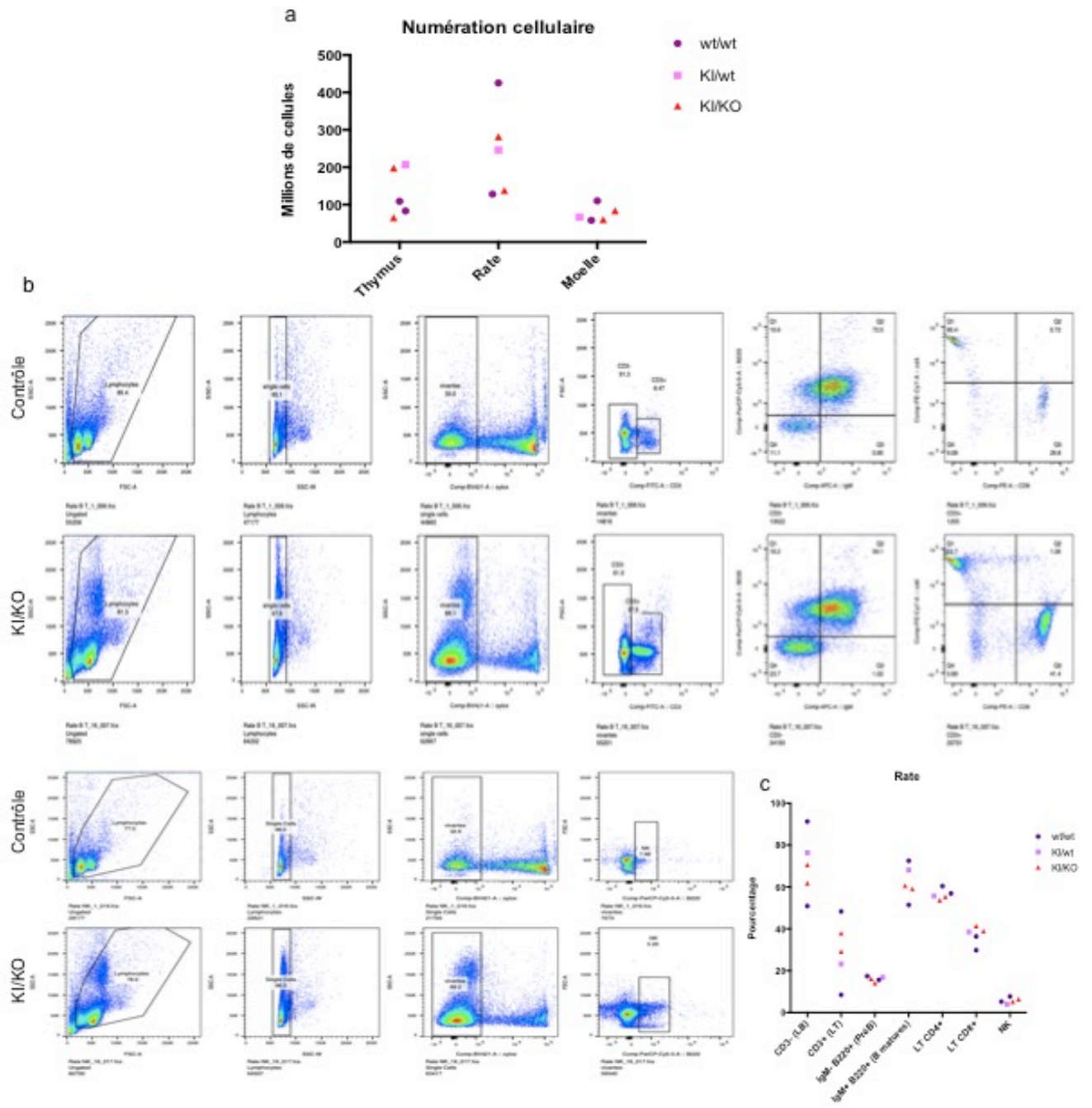


Figure 35 : Analyse des foyers Ku80. a) Immunofluorescence. b) Quantification du signal Ku80 obtenu en fonction de l'aire du noyau.

III : Autres modèles

III.1 Analyse des souris RAD50^{E1035Δ}

Les souris portant les mutations Rad50 d'intérêt ont été obtenues très récemment. Jusqu'à présent cinq souris ont pu être étudiées : deux souris contrôle (wt/wt), une souris du génotype KI/wt exprimant un allèle sauvage et un allèle *Rad50*^{E51035Δ} et deux souris KI/KO récapitulant le génotype du patient. Les populations de cellules immunitaires présentes dans la rate, la moelle et le thymus ont été analysées (Figure 36). Les premiers résultats obtenus ne semblent pas montrer de déficit immunitaire chez les souris mutées à 10 semaines de vie. En effet, le nombre absolu de cellules immunitaires par organe ainsi que la répartition en pourcentage de chaque type cellulaire par organe sont comparables entre les souris contrôle, KI/wt et KI/KO. En outre, contrairement aux données obtenues chez le patient, un défaut de lymphocytes B n'est pas détectable dans les souris KI/KO. Ces résultats seront approfondis par l'analyse d'autres animaux durant les mois à venir, à différents âges (voir discussion et perspectives).



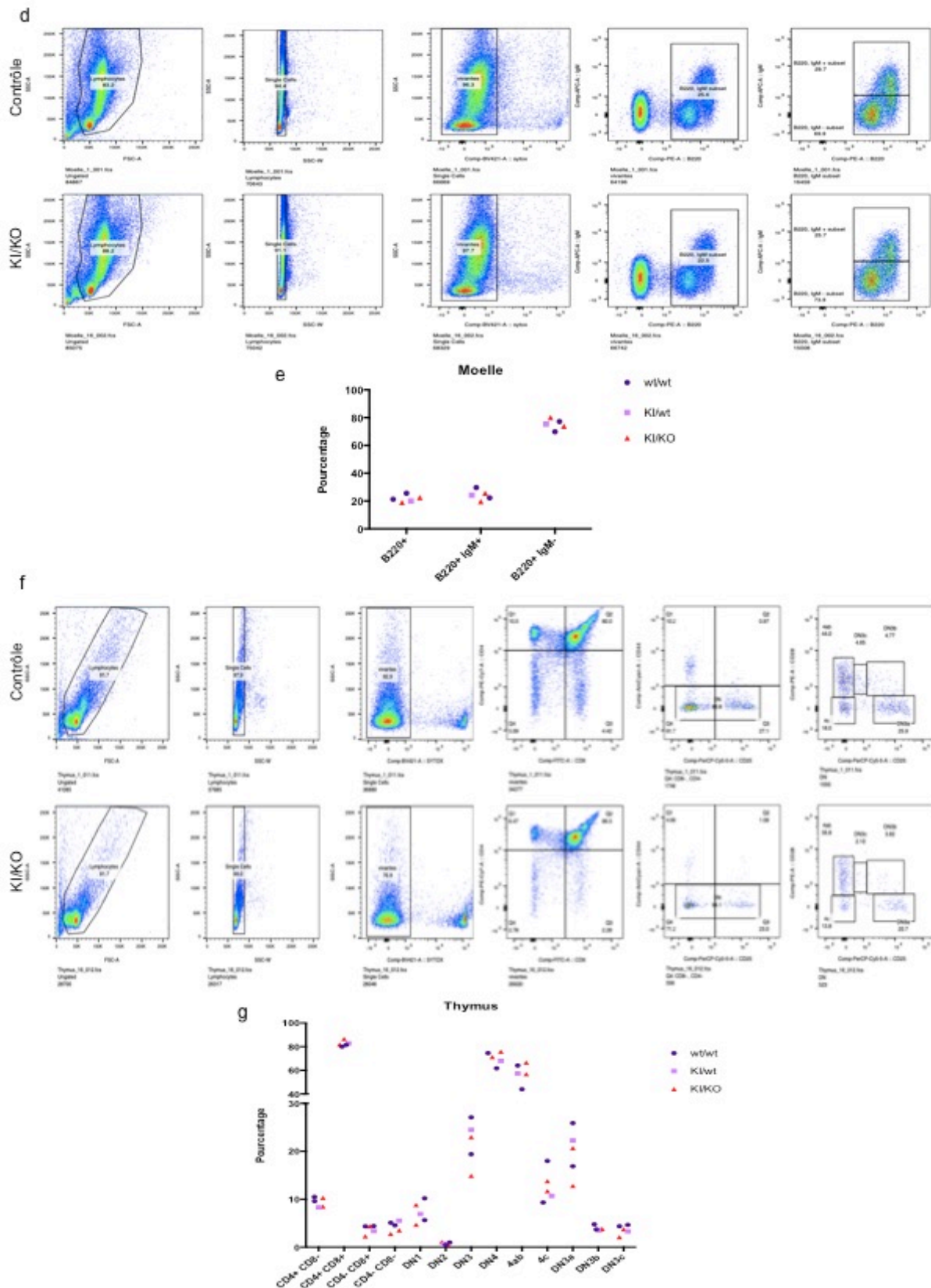


Figure 36 : Immunophénotypage des souris *Rad50*^{E1035Δ}. a) Nombre absolu de cellules immunitaires par organe. Dot plots du marquage des cellules de la rate (b), de la moelle (d) et du thymus (f). Exemples pour une souris contrôle et une souris KI/KO. Répartition des sous populations cellulaires de la rate (c), de la moelle (e) et du thymus (g) selon le génotype.

III.2 Analyses des levures

II.2.1 Délétion d'une heptade

Des souches de levure avec une délétion de l'heptade complète du domaine en bobine enroulée de rad50 portant l'acide aminé E1042 (*rad50-Δheptad*) ont été générées par notre collaborateur Marcel Hohl afin de déterminer quel pouvait être l'impact d'une délétion provoquant une réduction de la taille du domaine en bobine enroulée sans perturber l'enchaînement des heptades. Les souches *rad50-Δheptad* présentent une forte sensibilité à la CPT,   30 C et 37 C (Figure 37), se comportant de façon similaire à une souche *rad50Δ*. Une perturbation de la structure d'un unique côté du domaine en bobine enroulée de rad50 est donc extrêmement délétère pour le maintien de ses fonctions même si on conserve le phasage des heptades.

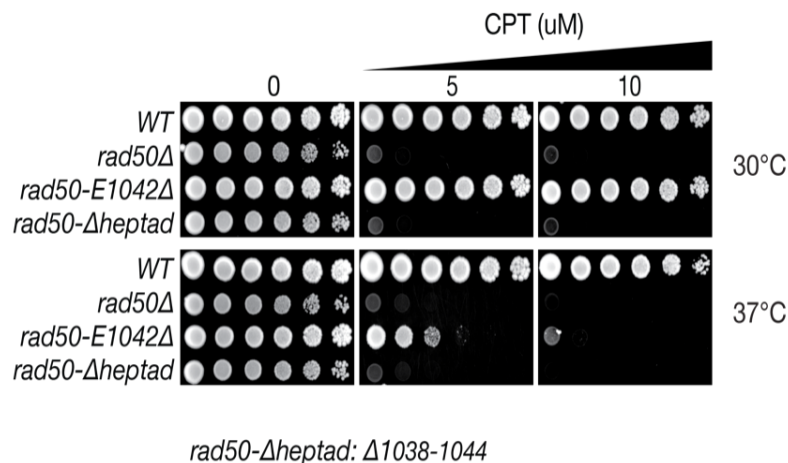


Figure 37 : Tests de sensibilité après délétion d'une heptade du domaine en bobine enroulée de rad50.

II.2.2 Sporulation

La sporulation et la viabilité des spores des souches *rad50^{E1042Δ}* homozygotes diplo ides ont été analysées (Figure 38). L'efficacité de sporulation ainsi que la viabilité des spores sont normales, montrant une absence de phénotype dans la méiose chez ces mutants. Il est à noter toutefois que ces expériences n'ont pu être réalisées à 37 C car la sporulation n'est pas efficace à cette température.

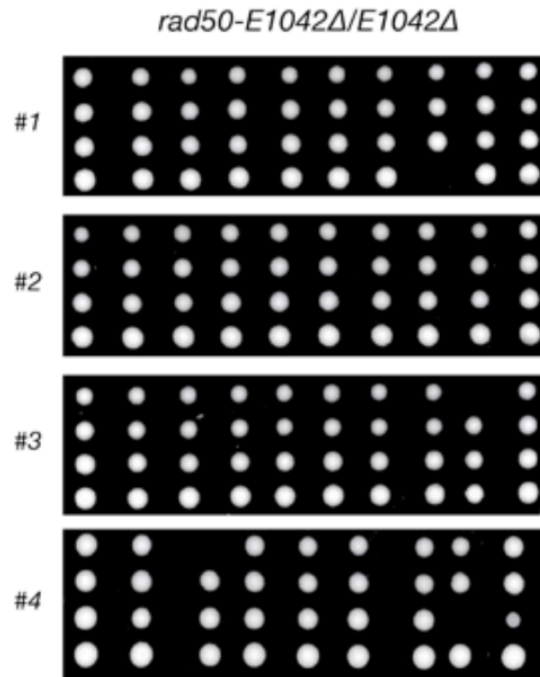
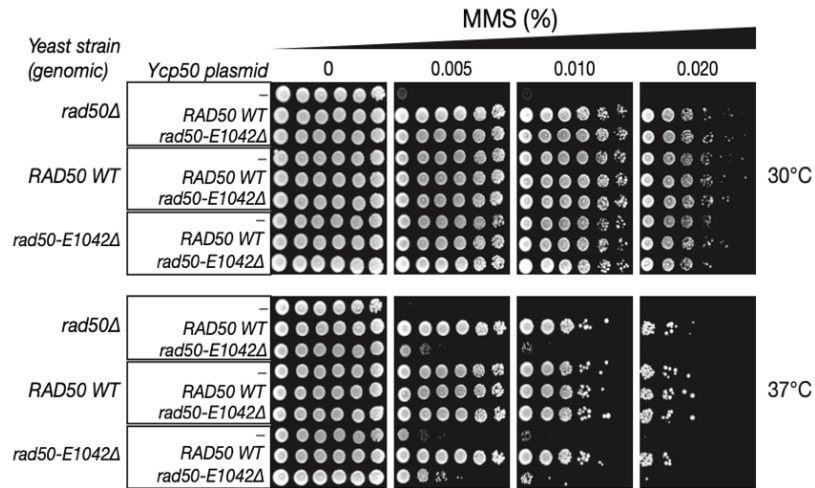


Figure 38 : Analyse de la sporulation et de la viabilité des spores des souches $rad50^{E1042\Delta}$ homozygotes diploïdes. Les spores montrent une viabilité de 97,4%.

II.2.3 Test d'un effet négatif dominant de la mutation $rad50^{E1042\Delta}$

Différentes formes de $rad50$ (sauvage ou mutée) ont été surexprimées dans des souches de levure sauvage, n'exprimant pas $rad50$ ou portant la mutation $rad50^{E1042\Delta}$ équivalente à celle du patient P1 (Figure 39). L'expression de la forme mutée $rad50^{E1042\Delta}$ dans une souche sauvage n'entraîne pas l'apparition d'un phénotype de sensibilité au MMS (Méthyl-Méthane Sulfonate, agent méthylant les bases de l'ADN) à 37°C. Il est à noter en revanche que l'expression d'une forme $rad50^{E1042\Delta}$ dans une souche $Rad50\Delta$ corrige le défaut de réparation à 30°C et que l'expression d'une forme sauvage de $rad50$ dans la souche $rad50^{E1042\Delta}$ complémente le défaut de réparation à 37°C, démontrant ainsi l'efficacité de l'expression ectopique de ces protéines. Des expériences similaires ont été menées sur des fibroblastes humains transformés avec l'antigène grand T de SV40 (Figure 39). Les cellules contrôle surexprimant la forme mutée de RAD50 ($RAD50^{E1035\Delta}$) ne montre pas de sensibilité à l'étoposide. Ces résultats suggèrent que la forme mutée de RAD50 n'exerce pas d'effet négatif dominant.

a



b

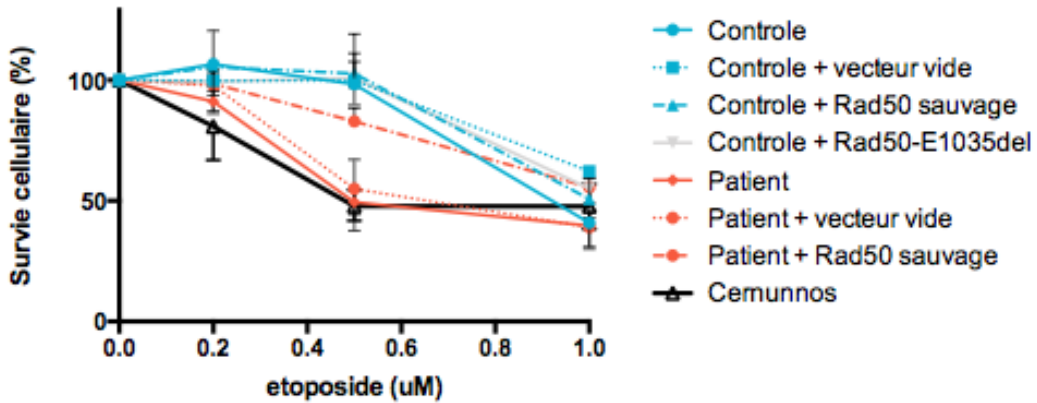


Figure 39 : Tests de l'effet dominant négatif de la mutation $RAD50^{E1035\Delta}$. Les souches de levure sauvage (a) ou les fibroblastes humains transformés avec l'antigène grand T de SV40 (b) surexprimant la forme mutée de RAD50 ne présentent pas de phénotype de sensibilité respectivement au MMS et à l'étoposide.

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

I : Un patient $RAD50^{E1035\Delta}$ au génotype et phénotype singuliers

I.1 $RAD50^{E1035\Delta}$ une mutation rare

Ce travail de thèse a porté sur l'analyse des cellules d'un patient (P1) présentant des symptômes cliniques évoquant un défaut de réparation de l'ADN tels qu'une microcéphalie, un déficit immunitaire associé à une insuffisance médullaire et un retard du développement. L'analyse génétique de ce patient a révélé des mutations bialléliques dans le gène $RAD50$: une mutation conduisant à un allèle nul et une seconde provoquant une délétion d'un acide aminé dans le domaine en bobine enroulée de $RAD50$ ($RAD50^{E1035\Delta}$).

La protéine $RAD50$ constitue un des partenaires du complexe MRN avec les protéines MRE11 et NBS1. Le complexe intervient principalement dans la détection, la signalisation et la réparation des cassures double brin par RH. Pour ce faire, MRE11 est dotée d'activités endo et exonucléasiques permettant la résection d'un des brins d'ADN de part et d'autre de la cassure. La protéine $RAD50$ est composée de trois domaines principaux : une tête globulaire à fonction ATPasique, un crochet de zinc permettant la dimérisation d'un complexe MRN et un long domaine flexible en bobine enroulée qui les relie. La mutation $RAD50^{E1035\Delta}$ portée par le patient conduit à l'expression d'une protéine $RAD50^{E1035\Delta}$ présentant la délétion d'un acide aminé (acide glutamique) dans une heptade répétée de son domaine en bobine enroulée. Il s'agit uniquement du troisième patient décrit dans le monde portant des mutations bialléliques de $RAD50$.

I.2 Des symptômes proches des patients ATLD ou NBS

Des déficits en MRE11 ou NBS1 entraînent respectivement une ATLD (Ataxia Telangiectasia Like Disorder) et un NBS (Nijmegen Breakage Syndrome). Le phénotype des trois patients $RAD50$ décrits se rapproche de ceux observés chez des patients NBS à tel point que le premier patient $RAD50$ découvert a, dans un premier temps, été considéré comme un patient NBS qualifiant la maladie liée à un défaut de $RAD50$ de syndrome « NBS-like » (**Waltes *et al.*, 2009, American Journal of Human Genetics**). Comme pour les patients ATLD ou NBS,

le patient P1 montre une sensibilité aux agents ionisants, un retard de développement, une microcéphalie et une insuffisance médullaire progressive. Les symptômes de la maladie liés à l'instabilité génomique s'installent en effet progressivement au fur et à mesure de l'accumulation de dommages à l'ADN notamment dans les cellules à haut potentiel prolifératif. A l'âge de 10 ans, P1 a dû être opéré d'une cataracte (opacification du cristallin de l'œil), symptôme pourtant absent chez les patients souffrant d'ATLD ou de NBS. Néanmoins, le premier patient RAD50 décrit présente une forte hypermétropie. Affection courante, l'hypermétropie peut être liée à une anomalie de la forme du cristallin. De plus, d'autres syndromes caractérisés par une instabilité génomique (l'ataxie télangectasie ou l'anémie de Fanconi par exemple (**Merriman et al., 2002, Ophthalmic Genetics**)) entraînent chez les patients une prédisposition aux cataractes. Enfin, un modèle de souris déficientes en *Nbn* (*NBS1* murin) montre un défaut de localisation nucléaire du complexe MRN entraînant une réduction de la prolifération des cellules épithéliales de la cornée et l'apparition de cataractes précoces (**Yang et al., 2006, DNA repair**). Finalement, ce symptôme observé chez P1 suggère que RAD50, au sein du complexe MRN, pourrait également participer au développement et au maintien du cristallin chez l'homme.

Les deux autres patients présentant des mutations bialléliques de *RAD50* (**Waltes et al., 2009, American Journal of Human Genetics** et **Regamin et al., 2019, Am J Med Genet**) et le patient P1 partagent des caractéristiques cliniques telles que la microcéphalie à la naissance, le retard de croissance et un décalage des acquisitions. Des preuves d'instabilité génomique ainsi qu'un défaut de réparation de l'ADN sont retrouvés dans les cellules de ces différents patients. Cependant, le développement d'un déficit immunitaire chez le patient P1 constitue une différence majeure avec les deux premiers patients, le rapprochant du phénotype des patients NBS.

I.3 Mutation *RAD50*^{E1035Δ} hypomorphe

Les mutations jusqu'ici décrites, entraînent la forte diminution d'expression de RAD50 associée à une diminution d'activité du complexe MRN, induisant un défaut dans la réponse aux dommages de l'ADN dépendante d'ATM. De manière surprenante, le patient P1 décrit dans notre étude ne montre pas de signes attestant un défaut d'activation d'ATM malgré des déficiences dans la réparation, la réplication et la résection de l'ADN.

P1 présente sur un allèle un codon stop prématuré hérité de sa mère. Dans les cellules de la mère saine, seulement 50% de protéines RAD50 sont détectées par Western Blot comparé à un contrôle. La mutation qu'elle porte constitue donc un allèle nul qu'elle a transmise à tous ses fils et à sa fille. Seul P1 est malade, confirmant que les fonctions de la protéine RAD50 peuvent être assurées malgré une diminution de son expression de moitié causée par une haploinsuffisance. Sur son deuxième allèle, P1 porte une mutation *de novo*, $RAD50^{E1035\Delta}$. Il en résulte que toutes les protéines RAD50 détectées dans les cellules du patient consistent en du $RAD50^{E1035\Delta}$ et que le phénotype observé peut être associé à cette mutation. Chez la souris, la perte totale de Rad50 est létale à l'état embryonnaire. De plus l'activation d'ATM est possible dans les cellules du patient. Il semble donc que la mutation $RAD50^{E1035\Delta}$ observée soit hypomorphe et permette d'analyser les conséquences fonctionnelles d'une mutation originale perturbant la structure du domaine en bobine enroulée.

II : Impacts de la mutation $RAD50^{E1035\Delta}$ sur l'activité du complexe MRN

II.1 Etude de différents modèles eucaryotes

II.1.1 *Chez la levure*

Chez la levure, la construction d'une souche portant la mutation correspondant à celle du patient P1 met en évidence un phénotype de thermosensibilité différent de celui retrouvé chez P1. A 30°C, les levures mutées se comportent comme une souche sauvage alors qu'à 37°C elles présentent un défaut drastique de réparation de l'ADN ainsi qu'un défaut d'activation de Tel1^{ATM} similaires à ceux observés dans des souches dépourvues de Rad50. En cassant un motif répété d'une heptade, la mutation pourrait à 37°C augmenter la flexibilité de la protéine Rad50, la déstabilisant et empêchant les fonctions du complexe MRX. Récemment il a été montré que le complexe intramoléculaire M₂R₂N₂ était stabilisé par des interactions au sein du domaine en bobine enroulée (**Park *et al.*, 2017, Nature Struct Mol Biol**). Dans la souche mutante, ces interactions pourraient être abolies à 37°C et complètement annihiler le complexe M₂R₂N₂. Des méthodes telles que la chromatographie d'exclusion pourrait permettre de déterminer quelles sont les conséquences sur la structure du complexe à 30°C et 37°C. Afin de savoir si, comme dans la levure, le défaut de réparation des cellules du patient

pouvait être aboli à 30°C, des expériences sur les fibroblastes du patient mis en culture à 30°C ont été tentées mais sont malheureusement restées infructueuses en raison de l'inconfort des cellules humaines en culture à cette température.

Néanmoins, le remplacement de l'acide aminé délété en position 1045 chez la levure par un autre conduit à l'expression d'un phénotype sauvage. C'est donc la présence d'un résidu, quelle que soit sa nature qui est primordiale pour les fonctions du domaine en bobine enroulée de RAD50 et non la nature de ce résidu. L'encombrement spatial de l'acide aminé à cette position pourrait donc être crucial pour maintenir la structure du domaine en bobine enroulée (probablement car il permet de conserver le motif d'heptade). En délétant l'acide aminé situé en face de l'acide glutamique délété par la mutation RAD50^{E1035Δ}, sur l'heptade en regard de l'heptade déstabilisée, on pourrait envisager la restauration d'une forme de symétrie dans le domaine en bobine enroulée et un phénotype sauvage. Trouver néanmoins l'acide aminé exact correspondant reste une difficulté.

II.1.2 *Modèle murin*

Afin d'approfondir les répercussions de la mutation sur l'activité du complexe MRN *in vivo*, un modèle murin *Rad50*^{E1035Δ} a été généré. Des résultats préliminaires sur les premières souris *Rad50*^{E1035Δ/+} et *Rad50*^{E1035Δ/-} ont pu être obtenus. Agées de deux mois et demi, les souris *Rad50*^{E1035Δ/-} récapitulant le génotype du patient présentaient un immunophénotypage comparable à celui des souris contrôles. Cependant, il est possible que ces souris soient encore trop jeunes pour développer des symptômes immunohématologiques qui pourraient s'accumuler au fur et à mesure de la maturation du système immunitaire. Ceci a été en particulier démontré dans un modèle de souris exprimant une mutation hypomorphe de DNA ligase IV dans lequel le défaut hématopoïétique ne se révèle que progressivement au cours du vieillissement des animaux ou lorsque la prolifération et la différenciation des cellules souches hématopoïétiques (CSH) sont stimulées (Nijnik *et al.*, 2007, *Nature*). Ainsi, le traitement des souris *Rad50*^{E1035Δ/-} avec du fluorouracil (5-FU), agent qui déplete les cellules souches hématopoïétiques, pourrait révéler l'expression d'un phénotype au cours de la reconstitution du système immunohématologique. Cette approche pourra être complétée par des expériences de greffes compétitives de cellules souches hématopoïétiques (sauvage *vs Rad50*^{E1035Δ/-}) dans des souris hôtes vides (NSG – NOD SCID Gamma) afin de déterminer si la mutation *Rad50*^{E1035Δ/-} affecte la capacité des CSH à proliférer et à se différencier dans tous les types de cellules sanguines.

Par ailleurs, les lymphocytes B matures détectés dans les souris *Rad50*^{E1035Δ/-} seront analysés pour leur capacité à réaliser les processus de recombinaison de commutation de classe des immunoglobulines (CSR) et de mutations somatiques (SHM) qui nécessitent tous deux un complexe MRN fonctionnel (**Dinkelmann et al., 2009, Nat Struct Mol Biol**).

La spermatogénèse sera également suivie. Il a en effet été démontré une altération du niveau d'expression de MRE11 et de RAD50 dans les testicules d'hommes souffrant d'arrêt de la maturation des cellules germinales (MA – Maturation Arrest) et du syndrome des cellules de Sertoli seules (SCOS – Sertoli cells only syndrome) conduisant à une azoospermie (**Hu et al., 2020 J Assist Reprod Genet**). De plus, le rôle essentiel du complexe MRN dans les processus de méiose (**Borde, 2007, Chromosome Research**) suggère que les souris *Rad50*^{E1035Δ/-} pourraient présenter des anomalies dans la formation des gamètes. Des souris présentant une mutation hypomorphique de *Mre11* (*Mre11*^{R633Z}) récapitulant le phénotype des patients ATLD ne présentent pas de défauts drastiques de la méiose mais un défaut de progression de la prophase méiotique, un rapprochement aberrant des chromosomes homologues durant l'étape de synapsis et une altération de la fréquence et de la position de marqueurs de crossing over (foci MLH1). Toutefois, les femelles *Mre11*^{R633Z} présentent un haut niveau de létalité embryonnaire mais la recombinaison méiotique n'est pas totalement déficiente car la présence de chiasmata (chevauchement de deux chromatides homologues) peut être détectée (**Cherry et al., 2007, Curr Biol**). De prime abord, la fertilité des mâles *Rad50*^{E1035Δ/-} pourra être suivie.

En outre, il pourra être intéressant de vérifier l'évolution du cristallin des yeux des souris *Rad50*^{E1035Δ/-}.

De plus, des lignées stables de fibroblastes embryonnaires de souris (MEFs) seront créées afin de tester les phénotypes de sensibilité aux différentes drogues observés chez le patient P1 ainsi que la stabilité des télomères dans des conditions où les télomères sont déprotégés (shRNA contre TRF2 ou expression d'un TRF2 dominant négatif).

Enfin, les souris *Rad50*^{E1035Δ/-} seront croisées avec des souris p53 KO (utilisées comme un accélérateur du développement tumoral) pour savoir si les défauts de réparation de l'ADN causés par *Rad50*^{E1035Δ} entraînent une augmentation de la formation de tumeurs chez la souris. En effet, bien que le patient RAD50 n'ait pas développé de cancer jusqu'à présent (mais le patient est encore jeune), cela n'exclut pas la possibilité que la mutation *Rad50*^{E1035Δ} puisse favoriser une instabilité génomique et le développement de tumeur. De plus, plusieurs modèles murins déficients pour les facteurs de réparation de l'ADN ne développent des

tumeurs que lorsqu'ils sont croisés avec des souris p53 KO ou lorsqu'ils sont âgés. Un exemple particulièrement approprié est le cas des souris déficientes pour la nucléase Artémis, chez lesquelles l'augmentation de la formation de tumeurs n'est visible que dans un fond p53 KO, révélant ainsi l'activité suppresseur de tumeur de cette nucléase (Rooney *et al.*, 2004, **Proc Natl Acad Sci USA**).

II.2 RAD50^{E1035Δ} et activité nucléasique de MRE11

Dans les cellules du patient, le recrutement de NBS1 et à fortiori du complexe MRN au site de cassure est constaté. De plus, la réponse aux dommages de l'ADN dépendante d'ATM est fonctionnelle. Toutefois, une sensibilité aux agents génotoxiques, un défaut de recrutement des protéines RPA et RAD51 après irradiation et une efficacité réduite de la RH sont observés. Ces constatations suggèrent que la mutation *RAD50^{E1035Δ}* impacte l'activité nucléasique de MRE11. Des phénotypes similaires sont observés dans les fibroblastes embryonnaires murin *Mre11^{H129N}* (Buis *et al.*, 2008, **Cell**) exprimant une protéine *Mre11* dont l'activité nucléasique est abolie. Cette ressemblance conforte l'idée que la mutation *RAD50^{E1035Δ}* impacte l'activité nucléasique de MRE11 *in vivo*. Toutefois, chez la souris un mutant homozygote de l'activité nucléasique de *Mre11* (*Mre11^{H129N/H129N}*) est non viable suggérant que *RAD50^{E1035Δ}* n'abolit que partiellement l'activité nucléasique de MRE11 ou qu'un autre mécanisme permet de parer le défaut d'activité de MRE11. Il serait donc intéressant de pouvoir comparer le phénotype des MEFs *Mre11^{H129N/-}* et *Rad50^{E1035Δ/-}* afin de mettre en évidence une éventuelle différence de sensibilité aux différents agents génotoxiques.

III : Mutation séparation de fonction

La mutation *RAD50^{E1035Δ}* conduit à un défaut de réparation, de réplication et de résection sans affecter le recrutement du complexe MRN au site de cassure ni l'activation d'ATM. Elle constitue donc une mutation séparation de fonction (Figure 40).

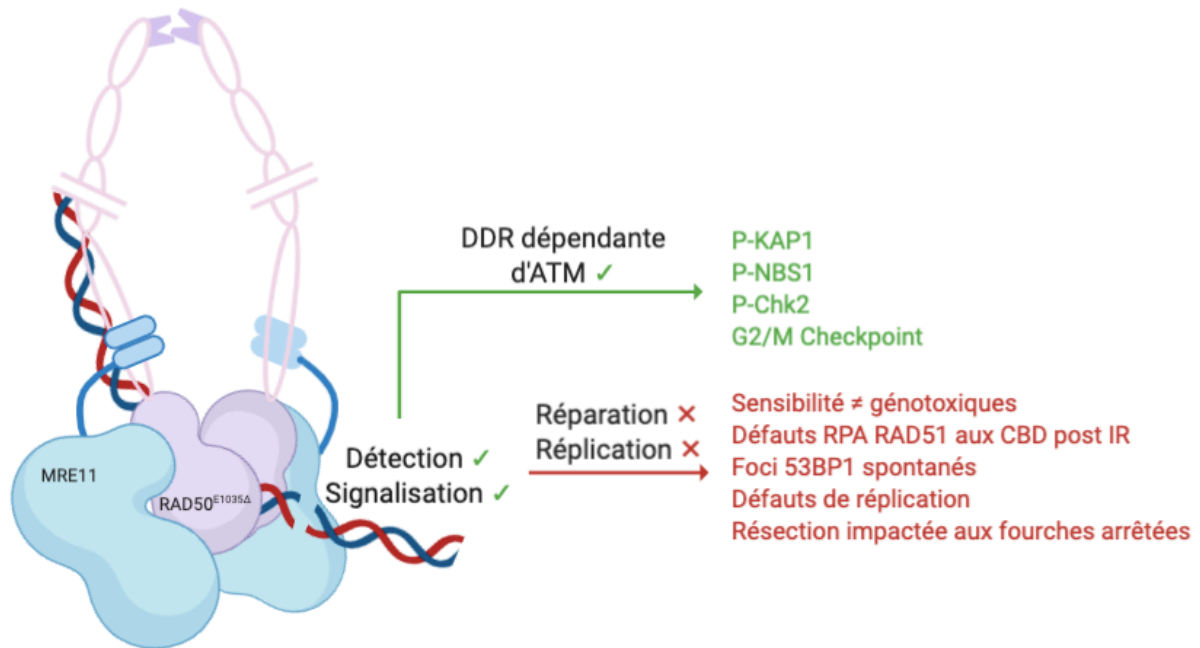


Figure 40 : Une mutation séparation de fonction. La déstabilisation d'une heptade répétée du domaine en bobine enroulée de RAD50 entraîne un dysfonctionnement de la réparation et de la réplication en maintenant la voie de la réponse aux dommages de l'ADN (DDR) dépendante d'ATM. CBD : Cassures double brin. IR : Irradiation.

Puisque l'activation d'ATM par MRN est dépendante de la fixation d'ATPs sur RAD50, la mutation ne semble pas interférer avec ce processus. L'hydrolyse des ATPs fixés déclenche l'activité endonucléasique de MRE11. Cette dernière est détectable par l'utilisation de protéines recombinantes purifiées *in vitro*, suggérant que la mutation n'impacte pas non plus l'hydrolyse de l'ATP. Toutefois, les expériences menées sur le complexe MRE11-RAD50^{E1035A} *in vitro* montrent un défaut de fixation du complexe à l'ADN et la réduction de son activité exonucléasique. Ces résultats, combinés au défaut de recrutement de RPA et de RAD51, suggèrent que la mutation impacte l'activité nucléasique de MRN nécessaire à la résection. Ainsi, ce sont les voies de réparation dépendantes de la résection qui semblent être affectées par la mutation RAD50^{E1035A}. Des premières expériences d'analyse de religation de plasmides linéarisés ont pu être menées afin d'estimer l'utilisation du NHEJ vs le MMEJ. Des premiers résultats encourageants montrent une diminution d'activité du MMEJ. De manière plus physiologique, il serait intéressant d'utiliser le système du CRISPR/cas9 dans les cellules afin d'introduire des doubles cassures d'ADN à des loci spécifiques à proximité de séquences microhomologues et d'analyser les séquences de ligation (Chen *et al.*, 2019, *Nucleic Acids Research*).

IV : Modélisation de l'impact de la mutation RAD50^{E1035Δ}

Ces différents résultats permettent d'établir un modèle selon lequel la mutation RAD50^{E1035Δ} induirait une contrainte moléculaire au sein du domaine en bobine enroulée qui rendrait difficile le passage entre une structure relâchée en forme d'anneau à celle de tige rigide. Il a déjà été proposé l'existence d'un intermédiaire conformationnel ayant hydrolysé l'ATP mais fixant toujours l'ADP et un ion phosphate. Cet intermédiaire permettrait l'activité endonucléasique de MRE11 à distance de la cassure, limiterait son activité exonucléasique et faciliterait l'accès du complexe à l'ADN double brin (Syed et Tainer, 2018, **Annual Review of Biochemistry**). On peut supposer que la mutation RAD50^{E1035Δ} entraîne la stabilisation de cet intermédiaire. Le complexe MRN conserverait sa capacité de fixation, d'hydrolyse de l'ATP et d'activation de l'activité endonucléasique de MRE11. A contrario, la protéine mutante ne pourrait pas se projeter vers la conformation finale ayant libérée l'ADP, nécessaire à l'induction de l'activité exonucléasique de MRE11 et à la résection de l'ADN. L'accès à l'ADN serait moins facile, comme montré dans les expériences *in vitro* (Figure 41).

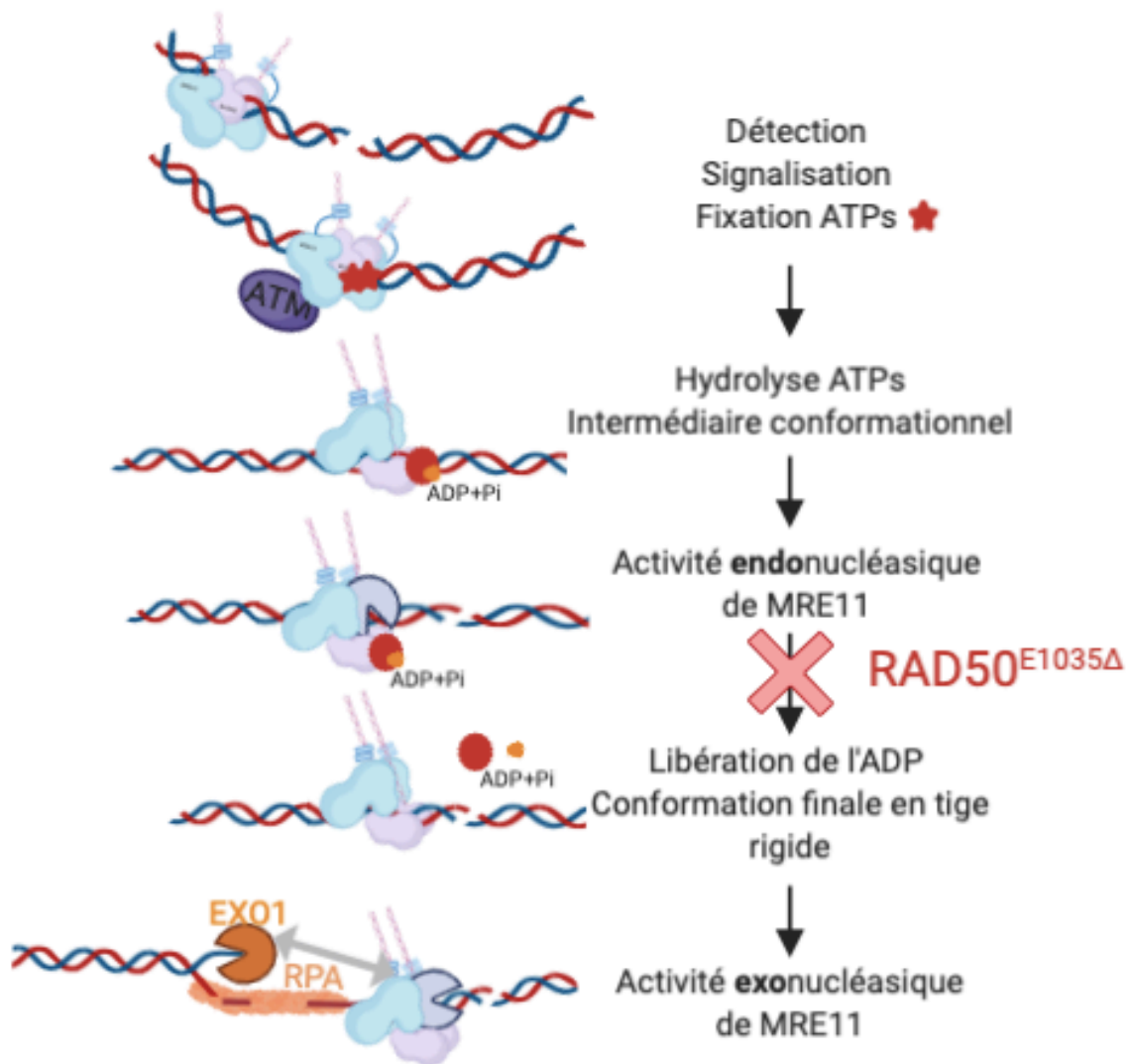


Figure 41 : Modèle proposé de l'impact de la mutation $RAD50^{E1035\Delta}$ sur l'activité nucléasique du complexe MRN. En stabilisant l'intermédiaire conformationnel ayant hydrolysé les ATPs mais fixant toujours l'ADP, la mutation $RAD50^{E1035\Delta}$ empêcherait la protéine de prendre une conformation de tige rigide et limiterait l'activité exonucléasique de MRE11.

De plus, selon les observations faites dans des protéines de la famille des SMC, l'adoption d'une forme de tige permettrait le glissement de l'ADN situé dans l'anneau vers la tête globulaire du complexe. Peu capable d'adopter une forme de tige rigide complète, la protéine mutante rencontrerait des difficultés dans le rapprochement des extrémités d'ADN, phénomène observé *in vitro* par une diminution de la capacité d'interaction du complexe muté avec l'ADN. Ainsi, pour tenter de déterminer quel est l'effet de la mutation $RAD50^{E1035\Delta}$ humaine sur la formation et la dynamique structurale du complexe $M_2R_2N_2$, une collaboration avec Mauro Modesti a été initiée. Une approche en molécule unique utilisant des pinces optiques et de la microscopie à force atomique sera réalisée pour plus directement observer la

dynamique du complexe $M_2R_2N_2$ et évaluer la capacité des complexes sauvage et mutant à se fixer à des molécules d'ADN individuelles intactes ou présentant des cassures double brin. Différentes conditions seront utilisées (ATP, AMP-PNP, différents cations divalents). Cette analyse devrait permettre de déterminer si la mutation $RAD50^{E1035\Delta}$ interfère avec les modifications conformationnelles tige/boucle.

Il a été démontré qu'un lien physique existe entre le complexe MRN et la protéine exonucléasique EXO1 (Myler *et al.*, 2017, *Mol Cell*). La mutation $RAD50^{E1035\Delta}$ pourrait interférer dans l'interaction des partenaires, limitant l'activité exonucléasique 5'-3' générant des segments simple brin et induisant le recrutement de RPA et RAD51.

Afin de tester cette possibilité, des analyses pourraient être réalisées en transfectant des HEK293T avec des vecteurs exprimant FLAG-RAD50sauvage ou FLAG-RAD50-E1035del (plus ou moins traitées avec des agents génotoxiques) suivi d'une immunoprécipitation des complexes avec un anticorps anti-FLAG couplés à des billes magnétiques puis d'une analyse par spectrométrie de masse. Une analyse comparative pourrait identifier des facteurs dont l'interaction avec le complexe MRN serait altérée par la mutation $RAD50^{E1035\Delta}$.

V : Remarques conclusives

Finalement, une délétion d'un unique acide aminé dans une heptade répétée du domaine en bobine enroulée de RAD50 compromet les activités de la protéine MRE11 au sein du complexe MRN. Cette mutation séparation de fonction entraîne un défaut de réparation, de réplication et de résection en maintenant la réponse aux dommages de l'ADN dépendante d'ATM, soulignant l'importance de l'intégrité du domaine en bobine enroulée de RAD50 pour potentiellement permettre les transitions conformationnelles entre un complexe relâché, ouvert en forme d'anneau et un complexe rigide, en forme de tige capable d'induire le rapprochement des brins d'ADN et la résection. Globalement, ce travail a mis en lumière le rôle essentiel du domaine en bobine enroulée de RAD50 dans la régulation des fonctions du complexe MRN permettant la réparation de l'ADN chez l'homme et la levure. Enfin, cette étude démontre à nouveau l'intérêt d'explorer les pathologies génétiques humaines rares associées à des défauts de stabilité de l'ADN pour préciser les mécanismes garantissant l'intégrité du génome.

ANNEXE

Durant ma thèse j'ai eu l'occasion de participer à un travail collaboratif avec l'équipe « Prolifération, Stress et Physiopathologie du Foie » dirigée par Chantal Desdouets du Centre de Recherche des Cordeliers (CRC). En partenariat avec Romain Donné, doctorant du groupe, des expériences de peignage moléculaire ont permis d'analyser la vitesse de progression des fourches de réplication dans les hépatocytes murins dans un contexte de NASH (stéatohépatite non alcoolique). Ce travail s'est concrétisé par la rédaction d'un article : « The pathogenesis of NAFLD : How replication stress participates to disease progression ? Romain Donne, Maëva Saroul-Aïnama, Pierre Cordier, Adel Hammoutene, Mounia Herrag, Marie Chansel-Da Cruz, Mira Stadler, Ivan Nemazanyy, Philippe Gual, Mathias Heikenwälder, Patrick Revy, Valérie Paradis and Chantal Desdouets » qui sera soumis prochainement pour publication.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Ait Saada, A., Lambert, S.A.E., Carr, A.M., 2018. Preserving replication fork integrity and competence via the homologous recombination pathway. *DNA Repair (Amst.)* 71, 135–147. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2018.08.017>
- Alani, E., Subbiah, S., Kleckner, N., n.d. The Yeast RAD50 Gene Encodes a Predicted 153-kD Protein Containing a Purine Nucleotide-Binding Domain and Two Large Heptad-Repeat Regions 11.
- Alemayehu, A., Fridrichova, I., 2007. The MRE11/RAD50/NBS1 complex destabilization in Lynch-syndrome patients. *Eur. J. Hum. Genet.* 15, 922–929. <https://doi.org/10.1038/sj.ejhg.5201858>
- Alt, F.W., Zhang, Y., Meng, F.-L., Guo, C., Schwer, B., 2013. Mechanisms of Programmed DNA Lesions and Genomic Instability in the Immune System. *Cell* 152, 417–429. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.01.007>
- Altan, B., Yokobori, T., Ide, M., Bai, T., Yanoma, T., Kimura, A., Kogure, N., Suzuki, M., Bao, P., Mochiki, E., Ogata, K., Handa, T., Kaira, K., Nishiyama, M., Asao, T., Oyama, T., Kuwano, H., 2016. High Expression of MRE11-RAD50-NBS1 Is Associated with Poor Prognosis and Chemoresistance in Gastric Cancer. *Anticancer Res.* 36, 5237–5247. <https://doi.org/10.21873/anticancer.11094>
- Anand, R., Ranjha, L., Cannavo, E., Cejka, P., 2016. Phosphorylated CtIP Functions as a Co-factor of the MRE11-RAD50-NBS1 Endonuclease in DNA End Resection. *Molecular Cell* 64, 940–950. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2016.10.017>
- Ando, T., Uchihashi, T., Scheuring, S., 2014. Filming biomolecular processes by high-speed atomic force microscopy. *Chem. Rev.* 114, 3120–3188. <https://doi.org/10.1021/cr4003837>
- Arora, S., Deshpande, R.A., Budd, M., Campbell, J., Revere, A., Zhang, X., Schmidt, K.H., Paull, T.T., 2017. Genetic Separation of Sae2 Nuclease Activity from Mre11 Nuclease Functions in Budding Yeast. *Mol Cell Biol* 37, e00156-17, e00156-17. <https://doi.org/10.1128/MCB.00156-17>
- Attwooll, C.L., Akpinar, M., Petrini, J.H.J., 2009. The mre11 complex and the response to dysfunctional telomeres. *Mol. Cell. Biol.* 29, 5540–5551. <https://doi.org/10.1128/MCB.00479-09>
- Bensimon, A., Simon, A., Chiffaudel, A., Croquette, V., Heslot, F., Bensimon, D., 1994. Alignment and sensitive detection of DNA by a moving interface. *Science* 265, 2096–2098. <https://doi.org/10.1126/science.7522347>
- Berland, A., Rosain, J., Kaltenbach, S., Allain, V., Mahlaoui, N., Melki, I., Fievet, A., Dubois d'Enghien, C., Ouachée-Chardin, M., Perrin, L., Auger, N., Cipe, F.E., Finocchi, A., Dogu, F., Suarez, F., Moshous, D., Leblanc, T., Belot, A., Fieschi, C., Boutboul, D., Malphettes, M., Galicier, L., Oksenhendler, E., Blanche, S., Fischer, A., Revy, P., Stoppa-Lyonnet, D., Picard, C., de Villartay, J.-P., 2019. PROMIDIS α : A T-cell receptor α signature associated with immunodeficiencies caused by V(D)J recombination defects. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 143, 325-334.e2. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2018.05.028>
- Black, S.J., Ozdemir, A.Y., Kashkina, E., Kent, T., Rusanov, T., Ristic, D., Shin, Y., Suma, A., Hoang, T., Chandramouly, G., Siddique, L.A., Borisonnik, N., Sullivan-Reed, K., Mallon, J.S., Skorski, T., Carnevale, V., Murakami, K.S., Wyman, C., Pomerantz, R.T., 2019. Molecular basis of microhomology-mediated end-joining by purified full-length Pol θ . *Nat Commun* 10. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-12272-9>
- Blastyák, A., Hajdú, I., Unk, I., Haracska, L., 2010. Role of Double-Stranded DNA Translocase Activity of Human HLTF in Replication of Damaged DNA. *Molecular and Cellular Biology* 30, 684–693. <https://doi.org/10.1128/MCB.00863-09>
- Blier, P.R., Griffith, A.J., Craft, J., Hardin, J.A., 1993. Binding of Ku protein to DNA. Measurement of affinity for ends and demonstration of binding to nicks. *J. Biol. Chem.* 268, 7594–7601.
- Blom, B., Spits, H., 2006. Development of human lymphoid cells. *Annu. Rev. Immunol.* 24, 287–320. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.24.021605.090612>
- Borde, V., 2007. The multiple roles of the Mre11 complex for meiotic recombination. *Chromosome Res* 15, 551–563. <https://doi.org/10.1007/s10577-007-1147-9>
- Bouwman, P., Jonkers, J., 2012. The effects of deregulated DNA damage signalling on cancer chemotherapy response and resistance. *Nat Rev Cancer* 12, 587–598. <https://doi.org/10.1038/nrc3342>
- Brandt, S., Samartzis, E.P., Zimmermann, A.-K., Fink, D., Moch, H., Noske, A., Dedes, K.J., 2017. Lack of MRE11-RAD50-NBS1 (MRN) complex detection occurs frequently in low-grade epithelial ovarian cancer. *BMC Cancer* 17, 44. <https://doi.org/10.1186/s12885-016-3026-2>
- Brouwer, I., Moschetti, T., Candelli, A., Garcin, E.B., Modesti, M., Pellegrini, L., Wuite, G.J., Peterman, E.J., 2018. Two distinct conformational states define the interaction of human RAD51-ATP with single-stranded DNA. *EMBO J* 37. <https://doi.org/10.15252/embj.201798162>
- Buck, D., Malivert, L., de Chasseval, R., Barraud, A., Fondanèche, M.-C., Sanal, O., Plebani, A., Stéphan, J.-L.,

- Hufnagel, M., le Deist, F., Fischer, A., Durandy, A., de Villartay, J.-P., Revy, P., 2006. Cernunnos, a Novel Nonhomologous End-Joining Factor, Is Mutated in Human Immunodeficiency with Microcephaly. *Cell* 124, 287–299. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.12.030>
- Buis, J., Wu, Y., Deng, Y., Leddon, J., Westfield, G., Eckersdorff, M., Sekiguchi, J.M., Chang, S., Ferguson, D.O., 2008. Mre11 Nuclease Activity has Essential Roles in DNA Repair and Genomic Stability Distinct from ATM Activation. *Cell* 135, 85–96. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.08.015>
- Burgers, P.M.J., Kunkel, T.A., 2017. Eukaryotic DNA Replication Fork. *Annu. Rev. Biochem.* 86, 417–438. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-061516-044709>
- Caburet, S., Conti, C., Bensimon, A., 2002. Combing the genome for genomic instability. *Trends Biotechnol.* 20, 344–350. [https://doi.org/10.1016/s0167-7799\(02\)01990-x](https://doi.org/10.1016/s0167-7799(02)01990-x)
- Cahill, D., Carney, J.P., 2007. Dimerization of the Rad50 protein is independent of the conserved hook domain. *Mutagenesis* 22, 269–274. <https://doi.org/10.1093/mutage/gem011>
- Cannavo, E., Cejka, P., 2014. Sae2 promotes dsDNA endonuclease activity within Mre11-Rad50-Xrs2 to resect DNA breaks. *Nature* 514, 122–125. <https://doi.org/10.1038/nature13771>
- Cannavo, E., Johnson, D., Andres, S.N., Kissling, V.M., Reinert, J.K., Garcia, V., Erie, D.A., Hess, D., Thomä, N.H., Enchev, R.I., Peter, M., Williams, R.S., Neale, M.J., Cejka, P., 2018. Regulatory control of DNA end resection by Sae2 phosphorylation. *Nat Commun* 9, 4016. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-06417-5>
- Cannon, B., Kuhnlein, J., Yang, S.-H., Cheng, A., Schindler, D., Stark, J.M., Russell, R., Paull, T.T., 2013. Visualization of local DNA unwinding by Mre11/Rad50/Nbs1 using single-molecule FRET. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 110, 18868–18873. <https://doi.org/10.1073/pnas.1309816110>
- Carr, A.M., Lambert, S., 2013. Replication stress-induced genome instability: the dark side of replication maintenance by homologous recombination. *J. Mol. Biol.* 425, 4733–4744. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2013.04.023>
- Cavazzana-Calvo, M., Hacein-Bey, S., Yates, F., de Villartay, J.P., Deist, F.L., Fischer, A., 2001. Gene therapy of severe combined immunodeficiencies. *J Gene Med* 6.
- Celeste, A., Petersen, S., Romanienko, P.J., Fernandez-Capetillo, O., Chen, H.T., Sedelnikova, O.A., Reina-San-Martin, B., Coppola, V., Meffre, E., Difilippantonio, M.J., Redon, C., Pilch, D.R., Orlaru, A., Eckhaus, M., Camerini-Otero, R.D., Tessarollo, L., Livak, F., Manova, K., Bonner, W.M., Nussenzweig, M.C., Nussenzweig, A., 2002. Genomic instability in mice lacking histone H2AX. *Science* 296, 922–927. <https://doi.org/10.1126/science.1069398>
- Celli, G.B., de Lange, T., 2005. DNA processing is not required for ATM-mediated telomere damage response after TRF2 deletion. *Nat. Cell Biol.* 7, 712–718. <https://doi.org/10.1038/ncb1275>
- Chai, W., Sfeir, A.J., Hoshiyama, H., Shay, J.W., Wright, W.E., 2006. The involvement of the Mre11/Rad50/Nbs1 complex in the generation of G-overhangs at human telomeres. *EMBO Rep.* 7, 225–230. <https://doi.org/10.1038/sj.embor.7400600>
- Chamankhah, M., Xiao, W., 1999. Formation of the yeast Mre11-Rad50-Xrs2 complex is correlated with DNA repair and telomere maintenance. *Nucleic Acids Res.* 27, 2072–2079. <https://doi.org/10.1093/nar/27.10.2072>
- Chanut, P., Britton, S., Coates, J., Jackson, S.P., Calsou, P., 2016. Coordinated nuclease activities counteract Ku at single-ended DNA double-strand breaks. *Nat Commun* 7, 12889. <https://doi.org/10.1038/ncomms12889>
- Chaplin, D.D., 2003. 1. Overview of the immune response. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 111, S442–S459. <https://doi.org/10.1067/mai.2003.125>
- Chatterjee, N., Walker, G.C., 2017. Mechanisms of DNA damage, repair, and mutagenesis: DNA Damage and Repair. *Environ. Mol. Mutagen.* 58, 235–263. <https://doi.org/10.1002/em.22087>
- Chen, C., Wang, Y., Mei, J.F., Li, S.S., Xu, H.X., Xiong, H.P., Wang, X.H., He, X., 2018. Targeting RAD50 increases sensitivity to radiotherapy in colorectal cancer cells. *Neoplasma* 65, 75–80. https://doi.org/10.4149/neo_2018_170219N128
- Chen, L., Trujillo, K.M., Van Komen, S., Roh, D.H., Krejci, L., Lewis, L.K., Resnick, M.A., Sung, P., Tomkinson, A.E., 2005. Effect of amino acid substitutions in the rad50 ATP binding domain on DNA double strand break repair in yeast. *J. Biol. Chem.* 280, 2620–2627. <https://doi.org/10.1074/jbc.M410192200>
- Chen, W., McKenna, A., Schreiber, J., Haeussler, M., Yin, Y., Agarwal, V., Noble, W.S., Shendure, J., 2019. Massively parallel profiling and predictive modeling of the outcomes of CRISPR/Cas9-mediated double-strand break repair. *Nucleic Acids Res* 47, 7989–8003. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz487>
- Cherry, S.M., Adelman, C.A., Theunissen, J.W., Hassold, T.J., Hunt, P.A., Petrini, J.H.J., 2007. The Mre11 Complex Influences DNA Repair, Synapsis, and Crossing Over in Murine Meiosis. *Current Biology* 17, 373–378. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2006.12.048>
- Chrzanowska, K.H., Kleijer, W.J., Krajewska-Walasek, M., Białocka, M., Gutkowska, A., Goryluk-

- Kozakiewicz, B., Michalkiewicz, J., Stachowski, J., Gregorek, H., Lysón-Wojciechowska, G., 1995. Eleven Polish patients with microcephaly, immunodeficiency, and chromosomal instability: the Nijmegen breakage syndrome. *Am. J. Med. Genet.* 57, 462–471. <https://doi.org/10.1002/ajmg.1320570321>
- Connelly, J.C., de Leau, E.S., Leach, D.R.F., 2003. Nucleolytic processing of a protein-bound DNA end by the *E. coli* SbcCD (MR) complex. *DNA Repair* 2, 795–807. [https://doi.org/10.1016/S1568-7864\(03\)00063-6](https://doi.org/10.1016/S1568-7864(03)00063-6)
- Conti, C., Caburet, S., Schurra, C., Bensimon, A., 2001. Molecular combing. *Curr Protoc Cytom* Chapter 8, Unit 8.10. <https://doi.org/10.1002/0471142956.cy0810s16>
- Coquel, F., Neumayer, C., Lin, Y.-L., Pasero, P., 2019. SAMHD1 and the innate immune response to cytosolic DNA during DNA replication. *Current Opinion in Immunology* 56, 24–30. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2018.09.017>
- Cox, B., Game, J., 1974. Repair systems in *Saccharomyces*. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 26, 257–264. [https://doi.org/10.1016/S0027-5107\(74\)80023-0](https://doi.org/10.1016/S0027-5107(74)80023-0)
- Cruz-García, A., López-Saavedra, A., Huertas, P., 2014. BRCA1 accelerates CtIP-mediated DNA-end resection. *Cell Rep* 9, 451–459. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.08.076>
- de Jager, M., van Noort, J., van Gent, D.C., Dekker, C., Kanaar, R., Wyman, C., 2001. Human Rad50/Mre11 is a flexible complex that can tether DNA ends. *Mol. Cell* 8, 1129–1135. [https://doi.org/10.1016/s1097-2765\(01\)00381-1](https://doi.org/10.1016/s1097-2765(01)00381-1)
- de Lange, T., Petrini, J.H., 2000. A new connection at human telomeres: association of the Mre11 complex with TRF2. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 65, 265–273. <https://doi.org/10.1101/sqb.2000.65.265>
- Delamarre, A., Barthe, A., de la Roche Saint-André, C., Luciano, P., Forey, R., Padioleau, I., Skrzypczak, M., Ginalski, K., Géli, V., Pasero, P., Lengronne, A., 2020. MRX Increases Chromatin Accessibility at Stalled Replication Forks to Promote Nascent DNA Resection and Cohesin Loading. *Mol. Cell* 77, 395–410.e3. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2019.10.029>
- Deng, Y., Guo, X., Ferguson, D.O., Chang, S., 2009. Multiple roles for MRE11 at uncapped telomeres. *Nature* 460, 914–918. <https://doi.org/10.1038/nature08196>
- Déry, U., Coulombe, Y., Rodrigue, A., Stasiak, A., Richard, S., Masson, J.-Y., 2008. A glycine-arginine domain in control of the human MRE11 DNA repair protein. *Mol. Cell. Biol.* 28, 3058–3069. <https://doi.org/10.1128/MCB.02025-07>
- Desai-Mehta, A., Cerosaletti, K.M., Concannon, P., 2001. Distinct Functional Domains of Nibrin Mediate Mre11 Binding, Focus Formation, and Nuclear Localization. *Mol. Cell. Biol.* 21, 2184–2191. <https://doi.org/10.1128/MCB.21.6.2184-2191.2001>
- Deshpande, R.A., Lee, J.-H., Arora, S., Paull, T.T., 2016. Nbs1 Converts the Human Mre11/Rad50 Nuclease Complex into an Endo/Exonuclease Machine Specific for Protein-DNA Adducts. *Molecular Cell* 64, 593–606. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2016.10.010>
- Deshpande, R.A., Lee, J.-H., Paull, T.T., 2017. Rad50 ATPase activity is regulated by DNA ends and requires coordination of both active sites. *Nucleic Acids Res* 45, 5255–5268. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx173>
- Deshpande, R.A., Myler, L.R., Soniat, M.M., Makhharashvili, N., Lee, L., Lees-Miller, S.P., Finkelstein, I.J., Paull, T.T., 2020. DNA-dependent protein kinase promotes DNA end processing by MRN and CtIP. *Sci Adv* 6, eaay0922. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aay0922>
- Deshpande, R.A., Williams, G.J., Limbo, O., Williams, R.S., Kuhnlein, J., Lee, J.-H., Classen, S., Guenther, G., Russell, P., Tainer, J.A., Paull, T.T., 2014. ATP-driven Rad50 conformations regulate DNA tethering, end resection, and ATM checkpoint signaling. *EMBO J.* 33, 482–500. <https://doi.org/10.1002/embj.201386100>
- Di Virgilio, M., Ying, C.Y., Gautier, J., 2009. PIKK-dependent phosphorylation of Mre11 induces MRN complex inactivation by disassembly from chromatin. *DNA Repair (Amst.)* 8, 1311–1320. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2009.07.006>
- Dimitrova, N., de Lange, T., 2009. Cell cycle-dependent role of MRN at dysfunctional telomeres: ATM signaling-dependent induction of nonhomologous end joining (NHEJ) in G1 and resection-mediated inhibition of NHEJ in G2. *Mol. Cell. Biol.* 29, 5552–5563. <https://doi.org/10.1128/MCB.00476-09>
- Dinkelmann, M., Spehalski, E., Stoneham, T., Buis, J., Wu, Y., Sekiguchi, J.M., Ferguson, D.O., 2009. Multiple functions of MRN in end-joining pathways during isotype class switching. *Nat Struct Mol Biol* 16, 808–813. <https://doi.org/10.1038/nsmb.1639>
- Escribano-Díaz, C., Orthwein, A., Fradet-Turcotte, A., Xing, M., Young, J.T.F., Tkáč, J., Cook, M.A., Rosebrock, A.P., Munro, M., Canny, M.D., Xu, D., Durocher, D., 2013. A Cell Cycle-Dependent Regulatory Circuit Composed of 53BP1-RIF1 and BRCA1-CtIP Controls DNA Repair Pathway Choice. *Molecular Cell* 49, 872–883. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2013.01.001>
- Gali, H., Mason-Osann, E., Flynn, R.L., 2019. Direct Visualization of DNA Replication at Telomeres Using DNA Fiber Combing Combined with Telomere FISH. *Methods Mol. Biol.* 1999, 319–325.

- https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9500-4_22
- Garcia, V., Phelps, S.E.L., Gray, S., Neale, M.J., 2011. Bidirectional resection of DNA double-strand breaks by Mre11 and Exo1. *Nature* 479, 241–244. <https://doi.org/10.1038/nature10515>
- Gatei, M., Kijas, A.W., Biard, D., Dörk, T., Lavin, M.F., 2014. RAD50 phosphorylation promotes ATR downstream signaling and DNA restart following replication stress. *Hum. Mol. Genet.* 23, 4232–4248. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddu141>
- Goldberg, M., Stucki, M., Falck, J., D'Amours, D., Rahman, D., Pappin, D., Bartek, J., Jackson, S.P., 2003. MDC1 is required for the intra-S-phase DNA damage checkpoint. *Nature* 421, 952–956. <https://doi.org/10.1038/nature01445>
- González-Prieto, R., Muñoz-Cabello, A.M., Cabello-Lobato, M.J., Prado, F., 2013. Rad51 replication fork recruitment is required for DNA damage tolerance. *EMBO J* 32, 1307–1321. <https://doi.org/10.1038/emboj.2013.73>
- Goodarzi, A.A., Yu, Y., Riballo, E., Douglas, P., Walker, S.A., Ye, R., Härer, C., Marchetti, C., Morrice, N., Jeggo, P.A., Lees-Miller, S.P., 2006. DNA-PK autophosphorylation facilitates Artemis endonuclease activity. *EMBO J* 25, 3880–3889. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601255>
- Gostissa, M., Alt, F.W., Chiarle, R., 2011. Mechanisms that Promote and Suppress Chromosomal Translocations in Lymphocytes. *Annu. Rev. Immunol.* 29, 319–350. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-031210-101329>
- Graham, T.G.W., Walter, J.C., Loparo, J.J., 2016. Two-Stage Synapsis of DNA Ends during Non-Homologous End Joining. *Mol Cell* 61, 850–858. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2016.02.010>
- Halazonetis, T.D., Gorgoulis, V.G., Bartek, J., 2008. An Oncogene-Induced DNA Damage Model for Cancer Development. *Science* 319, 1352–1355. <https://doi.org/10.1126/science.1140735>
- He, J., Shi, L.Z., Truong, L.N., Lu, C.-S., Razavian, N., Li, Y., Negrete, A., Shiloach, J., Berns, M.W., Wu, X., 2012. Rad50 Zinc Hook Is Important for the Mre11 Complex to Bind Chromosomal DNA Double-stranded Breaks and Initiate Various DNA Damage Responses. *J. Biol. Chem.* 287, 31747–31756. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.384750>
- Herdendorf, T.J., Albrecht, D.W., Benkovic, S.J., Nelson, S.W., 2011. Biochemical characterization of bacteriophage T4 Mre11-Rad50 complex. *J. Biol. Chem.* 286, 2382–2392. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.178871>
- Herdendorf, T.J., Nelson, S.W., 2014. Catalytic Mechanism of Bacteriophage T4 Rad50 ATP Hydrolysis. *Biochemistry* 53, 5647–5660. <https://doi.org/10.1021/bi500558d>
- Herrick, J., Bensimon, A., n.d. Single molecule analysis of DNA replication 13.
- Heyer, W.-D., Ehmsen, K.T., Liu, J., 2010. Regulation of Homologous Recombination in Eukaryotes. *Annu. Rev. Genet.* 44, 113–139. <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-051710-150955>
- Ho, V., Chung, L., Revoltar, M., Lim, S.H., Tut, T.-G., Abubakar, A., Henderson, C.J., Chua, W., Ng, W., Lee, M., De Souza, P., Morgan, M., Lee, C.S., Shin, J.-S., 2016. MRE11 and ATM Expression Levels Predict Rectal Cancer Survival and Their Association with Radiotherapy Response. *PLoS ONE* 11, e0167675. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0167675>
- Hohl, M., Kwon, Y., Galván, S.M., Xue, X., Tous, C., Aguilera, A., Sung, P., Petrini, J.H.J., 2011. The Rad50 coiled-coil domain is indispensable for Mre11 complex functions. *Nat Struct Mol Biol* 18, 1124–1131. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2116>
- Hopfner, K.-P., Craig, L., Moncalian, G., Zinkel, R.A., Usui, T., Owen, B.A.L., Karcher, A., Henderson, B., Bodmer, J.-L., McMurray, C.T., Carney, J.P., Petrini, J.H.J., Tainer, J.A., 2002. The Rad50 zinc-hook is a structure joining Mre11 complexes in DNA recombination and repair. *Nature* 418, 562–566. <https://doi.org/10.1038/nature00922>
- Hopfner, K.-P., Karcher, A., Craig, L., Woo, T.T., Carney, J.P., Tainer, J.A., 2001. Structural Biochemistry and Interaction Architecture of the DNA Double-Strand Break Repair Mre11 Nuclease and Rad50-ATPase. *Cell* 105, 473–485. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(01\)00335-X](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(01)00335-X)
- Hopfner, K.-P., Karcher, A., Shin, D.S., Craig, L., Arthur, L.M., Carney, J.P., Tainer, J.A., n.d. Structural Biology of Rad50 ATPase: ATP-Driven Conformational Control in DNA Double-Strand Break Repair and the ABC-ATPase Superfamily 12.
- Hopfner, K.P., Putnam, C.D., Tainer, J.A., 2002. DNA double-strand break repair from head to tail. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 12, 115–122. [https://doi.org/10.1016/s0959-440x\(02\)00297-x](https://doi.org/10.1016/s0959-440x(02)00297-x)
- Hu, M., Li, L., Liu, S., Lou, Y., Wang, L., Le, F., Li, H., Wang, Q., Lou, H., Wang, N., Jin, F., 2020. Decreased expression of MRE11 and RAD50 in testes from humans with spermatogenic failure. *J. Assist. Reprod. Genet.* 37, 331–340. <https://doi.org/10.1007/s10815-019-01686-5>
- Huertas, P., 2010. DNA resection in eukaryotes: deciding how to fix the break. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 17, 11–16. <https://doi.org/10.1038/nsmb.1710>
- Huertas, P., Cortés-Ledesma, F., Sartori, A.A., Aguilera, A., Jackson, S.P., 2008. CDK targets Sae2 to control DNA-end resection and homologous recombination. *Nature* 455, 689–692.

- <https://doi.org/10.1038/nature07215>
- Hunter, N., 2015. Meiotic Recombination: The Essence of Heredity. *Cold Spring Harb Perspect Biol* a016618. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a016618>
- Hustedt, N., Durocher, D., 2017. The control of DNA repair by the cell cycle. *Nat Cell Biol* 19, 1–9. <https://doi.org/10.1038/ncb3452>
- Kahl, V.F.S., Allen, J.A.M., Nelson, C.B., Sobinoff, A.P., Lee, M., Kilo, T., Vasireddy, R.S., Pickett, H.A., 2020. Telomere Length Measurement by Molecular Combing. *Front Cell Dev Biol* 8, 493. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.00493>
- Käshammer, L., Saathoff, J.-H., Lammens, K., Gut, F., Bartho, J., Alt, A., Kessler, B., Hopfner, K.-P., 2019. Mechanism of DNA End Sensing and Processing by the Mre11-Rad50 Complex. *Molecular Cell* 76, 382–394.e6. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2019.07.035>
- Kim, J.H., Grosbart, M., Anand, R., Wyman, C., Cejka, P., Petrini, J.H.J., 2017. The Mre11-Nbs1 Interface Is Essential for Viability and Tumor Suppression. *Cell Reports* 18, 496–507. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.12.035>
- Kironmai, K.M., Muniyappa, K., 1997. Alteration of telomeric sequences and senescence caused by mutations in RAD50 of *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Cells* 2, 443–455. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2443.1997.1330331.x>
- Kondo, T., Kobayashi, J., Saitoh, T., Maruyama, K., Ishii, K.J., Barber, G.N., Komatsu, K., Akira, S., Kawai, T., 2013. DNA damage sensor MRE11 recognizes cytosolic double-stranded DNA and induces type I interferon by regulating STING trafficking. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 110, 2969–2974. <https://doi.org/10.1073/pnas.1222694110>
- Lafrance-Vanasse, J., Williams, G.J., Tainer, J.A., 2015. Envisioning the dynamics and flexibility of Mre11-Rad50-Nbs1 complex to decipher its roles in DNA replication and repair. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 117, 182–193. <https://doi.org/10.1016/j.pbiomolbio.2014.12.004>
- Lammens, K., Bemeleit, D.J., Möckel, C., Clausing, E., Schele, A., Hartung, S., Schiller, C.B., Lucas, M., Angermüller, C., Söding, J., Sträßer, K., Hopfner, K.-P., 2011. The Mre11:Rad50 Structure Shows an ATP-Dependent Molecular Clamp in DNA Double-Strand Break Repair. *Cell* 145, 54–66. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.038>
- Lee, J.-H., 2004. Direct Activation of the ATM Protein Kinase by the Mre11/Rad50/Nbs1 Complex. *Science* 304, 93–96. <https://doi.org/10.1126/science.1091496>
- Lee, J.-H., Goodarzi, A.A., Jeggo, P.A., Paull, T.T., 2010. 53BP1 promotes ATM activity through direct interactions with the MRN complex. *EMBO J.* 29, 574–585. <https://doi.org/10.1038/emboj.2009.372>
- Lee-Six, H., Øbro, N.F., Shepherd, M.S., Grossmann, S., Dawson, K., Belmonte, M., Osborne, R.J., Huntly, B.J.P., Martincorena, I., Anderson, E., O’Neill, L., Stratton, M.R., Laurenti, E., Green, A.R., Kent, D.G., Campbell, P.J., 2018. Population dynamics of normal human blood inferred from somatic mutations. *Nature* 561, 473–478. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0497-0>
- Li, S., Dong, Z., Yang, S., Feng, J., Li, Q., 2019. Chaperoning RPA during DNA metabolism. *Curr. Genet.* 65, 857–864. <https://doi.org/10.1007/s00294-019-00945-3>
- Lieber, M.R., 2010. The Mechanism of Double-Strand DNA Break Repair by the Nonhomologous DNA End Joining Pathway. *Annu Rev Biochem* 79, 181–211. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.052308.093131>
- Lilley, C.E., Schwartz, R.A., Weitzman, M.D., 2007. Using or abusing: viruses and the cellular DNA damage response. *Trends Microbiol.* 15, 119–126. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2007.01.003>
- Lim, H.S., Kim, J.S., Park, Y.B., Gwon, G.H., Cho, Y., 2011. Crystal structure of the Mre11-Rad50-ATP S complex: understanding the interplay between Mre11 and Rad50. *Genes & Development* 25, 1091–1104. <https://doi.org/10.1101/gad.203781>
- Liu, J., Doty, T., Gibson, B., Heyer, W.-D., 2010. Human BRCA2 protein promotes RAD51 filament formation on RPA-covered ssDNA. *Nat Struct Mol Biol* 17, 1260–1262. <https://doi.org/10.1038/nsmb.1904>
- Liu, L.F., Desai, S.D., Li, T.-K., Mao, Y., Sun, M., Sim, S.-P., 2000. Mechanism of Action of Camptothecin. *Annals of the New York Academy of Sciences* 922, 1–10. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2000.tb07020.x>
- Lloyd, J., Chapman, J.R., Clapperton, J.A., Haire, L.F., Hartsuiker, E., Li, J., Carr, A.M., Jackson, S.P., Smerdon, S.J., 2009. A Supramodular FHA/BRCT-Repeat Architecture Mediates Nbs1 Adaptor Function in Response to DNA Damage. *Cell* 139, 100–111. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.07.043>
- Loh, P.-R., Genovese, G., Handsaker, R.E., Finucane, H.K., Reshef, Y.A., Palamara, P.F., Birmann, B.M., Talkowski, M.E., Bakhoun, S.F., McCarroll, S.A., Price, A.L., 2018. Insights about clonal hematopoiesis from 8,342 mosaic chromosomal alterations. *Nature* 559, 350–355. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0321-x>
- Lukas, C., Falck, J., Bartkova, J., Bartek, J., Lukas, J., 2003. Distinct spatiotemporal dynamics of mammalian checkpoint regulators induced by DNA damage. *Nat. Cell Biol.* 5, 255–260.

- <https://doi.org/10.1038/ncb945>
- Lukas, C., Melander, F., Stucki, M., Falck, J., Bekker-Jensen, S., Goldberg, M., Lerenthal, Y., Jackson, S.P., Bartek, J., Lukas, J., 2004. Mdc1 couples DNA double-strand break recognition by Nbs1 with its H2AX-dependent chromatin retention. *EMBO J.* 23, 2674–2683. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600269>
- Luo, G., Yao, M.S., Bender, C.F., Mills, M., Bladl, A.R., Bradley, A., Petrini, J.H., 1999. Disruption of mRad50 causes embryonic stem cell lethality, abnormal embryonic development, and sensitivity to ionizing radiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96, 7376–7381. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.13.7376>
- Majka, J., Alford, B., Ausio, J., Finn, R.M., McMurray, C.T., 2012. ATP Hydrolysis by RAD50 Protein Switches MRE11 Enzyme from Endonuclease to Exonuclease. *J. Biol. Chem.* 287, 2328–2341. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.307041>
- Malu, S., De Ioannes, P., Kozlov, M., Greene, M., Francis, D., Hanna, M., Pena, J., Escalante, C.R., Kurosawa, A., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Adachi, N., Vezzone, P., Villa, A., Aggarwal, A.K., Cortes, P., 2012. Artemis C-terminal region facilitates V(D)J recombination through its interactions with DNA Ligase IV and DNA-PKcs. *J Exp Med* 209, 955–963. <https://doi.org/10.1084/jem.20111437>
- Maser, R.S., Monsen, K.J., Nelms, B.E., Petrini, J.H., 1997. hMre11 and hRad50 nuclear foci are induced during the normal cellular response to DNA double-strand breaks. *Mol. Cell. Biol.* 17, 6087–6096. <https://doi.org/10.1128/mcb.17.10.6087>
- Matsumoto, Y., Miyamoto, T., Sakamoto, H., Izumi, H., Nakazawa, Y., Ogi, T., Tahara, H., Oku, S., Hiramoto, A., Shiiki, T., Fujisawa, Y., Ohashi, H., Sakemi, Y., Matsuura, S., 2011. Two unrelated patients with MRE11A mutations and Nijmegen breakage syndrome-like severe microcephaly. *DNA Repair (Amst.)* 10, 314–321. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2010.12.002>
- Matsuoka, S., Ballif, B.A., Smogorzewska, A., McDonald, E.R., Hurov, K.E., Luo, J., Bakalarski, C.E., Zhao, Z., Solimini, N., Lerenthal, Y., Shiloh, Y., Gygi, S.P., Elledge, S.J., 2007. ATM and ATR substrate analysis reveals extensive protein networks responsive to DNA damage. *Science* 316, 1160–1166. <https://doi.org/10.1126/science.1140321>
- Maya-Mendoza, A., Moudry, P., Merchut-Maya, J.M., Lee, M., Strauss, R., Bartek, J., 2018. High speed of fork progression induces DNA replication stress and genomic instability. *Nature* 559, 279–284. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0261-5>
- Mendez-Bermudez, A., Lototska, L., Bauwens, S., Giraud-Panis, M.-J., Croce, O., Jamet, K., Irizar, A., Mowinkel, M., Koundrioukoff, S., Nottet, N., Almouzni, G., Teulade-Fichou, M.-P., Schertzer, M., Perderiset, M., Londoño-Vallejo, A., Debatisse, M., Gilson, E., Ye, J., 2018. Genome-wide Control of Heterochromatin Replication by the Telomere Capping Protein TRF2. *Mol. Cell* 70, 449-461.e5. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2018.03.036>
- Merriman, M., Mora, J., McGaughran, J., 2002. Fanconi anemia and primary cataracts: first case. *Ophthalmic Genetics* 23, 253–255. <https://doi.org/10.1076/opge.23.4.253.13880>
- Methot, S.P., Di Noia, J.M., 2017. Molecular Mechanisms of Somatic Hypermutation and Class Switch Recombination, in: *Advances in Immunology*. Elsevier, pp. 37–87. <https://doi.org/10.1016/bs.ai.2016.11.002>
- Michalet, X., Ekong, R., Fougereuse, F., Rousseaux, S., Schurra, C., Hornigold, N., Slegtenhorst, M. van, Wolfe, J., Povey, S., Beckmann, J.S., Bensimon, A., 1997. Dynamic Molecular Combing: Stretching the Whole Human Genome for High-Resolution Studies. *Science* 277, 1518–1523. <https://doi.org/10.1126/science.277.5331.1518>
- Mirzoeva, O.K., Petrini, J.H., 2001. DNA damage-dependent nuclear dynamics of the Mre11 complex. *Mol. Cell. Biol.* 21, 281–288. <https://doi.org/10.1128/MCB.21.1.281-288.2001>
- Möckel, C., Lammens, K., Schele, A., Hopfner, K.-P., 2012. ATP driven structural changes of the bacterial Mre11:Rad50 catalytic head complex. *Nucleic Acids Res.* 40, 914–927. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr749>
- Moreno-Herrero, F., de Jager, M., Dekker, N.H., Kanaar, R., Wyman, C., Dekker, C., 2005. Mesoscale conformational changes in the DNA-repair complex Rad50/Mre11/Nbs1 upon binding DNA. *Nature* 437, 440–443. <https://doi.org/10.1038/nature03927>
- Moshous, D., Callebaut, I., de Chasseval, R., Corneo, B., Cavazzana-Calvo, M., Le Deist, F., Tezcan, I., Sanal, O., Bertrand, Y., Philippe, N., Fischer, A., de Villartay, J.-P., 2001. Artemis, a Novel DNA Double-Strand Break Repair/V(D)J Recombination Protein, Is Mutated in Human Severe Combined Immune Deficiency. *Cell* 105, 177–186. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(01\)00309-9](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(01)00309-9)
- Moynahan, M.E., Jasin, M., 2010. Mitotic homologous recombination maintains genomic stability and suppresses tumorigenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 11, 196–207. <https://doi.org/10.1038/nrm2851>
- Myler, L.R., Gallardo, I.F., Soniat, M.M., Deshpande, R.A., Gonzalez, X.B., Kim, Y., Paull, T.T., Finkelstein, I.J., 2017. Single-Molecule Imaging Reveals How Mre11-Rad50-Nbs1 Initiates DNA Break Repair. *Mol. Cell* 67, 891-898.e4. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2017.08.002>

- Nepomuceno, T.C., De Gregoriis, G., Bastos de Oliveira, F.M., Suarez-Kurtz, G., Monteiro, A.N., Carvalho, M.A., 2017. The Role of PALB2 in the DNA Damage Response and Cancer Predisposition. *Int J Mol Sci* 18. <https://doi.org/10.3390/ijms18091886>
- Nijnik, A., Woodbine, L., Marchetti, C., Dawson, S., Lambe, T., Liu, C., Rodrigues, N.P., Crockford, T.L., Cabuy, E., Vindigni, A., Enver, T., Bell, J.I., Slijepcevic, P., Goodnow, C.C., Jeggo, P.A., Cornall, R.J., 2007. DNA repair is limiting for haematopoietic stem cells during ageing. *Nature* 447, 686–690. <https://doi.org/10.1038/nature05875>
- Nimonkar, A.V., Genschel, J., Kinoshita, E., Polaczek, P., Campbell, J.L., Wyman, C., Modrich, P., Kowalczykowski, S.C., 2011. BLM–DNA2–RPA–MRN and EXO1–BLM–RPA–MRN constitute two DNA end resection machineries for human DNA break repair. *Genes Dev* 25, 350–362. <https://doi.org/10.1101/gad.2003811>
- Oh, J., Al-Zain, A., Cannavo, E., Cejka, P., Symington, L.S., 2016. Xrs2 Dependent and Independent Functions of the Mre11-Rad50 Complex. *Molecular Cell* 64, 405–415. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2016.09.011>
- Oh, J., Symington, L.S., 2018. Role of the Mre11 Complex in Preserving Genome Integrity. *Genes (Basel)* 9. <https://doi.org/10.3390/genes9120589>
- Olson, E., Nievera, C.J., Lee, A.Y.-L., Chen, L., Wu, X., 2007. The Mre11-Rad50-Nbs1 Complex Acts Both Upstream and Downstream of Ataxia Telangiectasia Mutated and Rad3-related Protein (ATR) to Regulate the S-phase Checkpoint following UV Treatment. *J. Biol. Chem.* 282, 22939–22952. <https://doi.org/10.1074/jbc.M702162200>
- Oshima, J., Sidorova, J.M., Monnat, R.J., 2017. Werner syndrome: Clinical features, pathogenesis and potential therapeutic interventions. *Ageing Research Reviews* 33, 105–114. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2016.03.002>
- Osorio, F.G., Rosendahl Huber, A., Oka, R., Verheul, M., Patel, S.H., Hasaart, K., de la Fonteijne, L., Varela, I., Camargo, F.D., van Boxtel, R., 2018. Somatic Mutations Reveal Lineage Relationships and Age-Related Mutagenesis in Human Hematopoiesis. *Cell Rep* 25, 2308–2316.e4. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.11.014>
- Pannunzio, N.R., Watanabe, G., Lieber, M.R., 2018. Nonhomologous DNA end-joining for repair of DNA double-strand breaks. *J Biol Chem* 293, 10512–10523. <https://doi.org/10.1074/jbc.TM117.000374>
- Park, Y.B., Hohl, M., Padjasek, M., Jeong, E., Jin, K.S., Kręzel, A., Petrini, J.H.J., Cho, Y., 2017. Eukaryotic Rad50 functions as a rod-shaped dimer. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 24, 248–257. <https://doi.org/10.1038/nsmb.3369>
- Pasero, P., Bensimon, A., Schwob, E., 2002. Single-molecule analysis reveals clustering and epigenetic regulation of replication origins at the yeast rDNA locus. *Genes Dev.* 16, 2479–2484. <https://doi.org/10.1101/gad.232902>
- Patel, A.G., Sarkaria, J.N., Kaufmann, S.H., 2011. Nonhomologous end joining drives poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) inhibitor lethality in homologous recombination-deficient cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, 3406–3411. <https://doi.org/10.1073/pnas.1013715108>
- Patel, D.R., Weiss, R.S., 2018. A tough row to hoe: when replication forks encounter DNA damage. *Biochemical Society Transactions* 46, 1643–1651. <https://doi.org/10.1042/BST20180308>
- Paull, T.T., Gellert, M., 1999. Nbs1 potentiates ATP-driven DNA unwinding and endonuclease cleavage by the Mre11/Rad50 complex. *Genes Dev.* 13, 1276–1288. <https://doi.org/10.1101/gad.13.10.1276>
- Petermann, E., Orta, M.L., Issaeva, N., Schultz, N., Helleday, T., 2010. Hydroxyurea-Stalled Replication Forks Become Progressively Inactivated and Require Two Different RAD51-Mediated Pathways for Restart and Repair. *Molecular Cell* 37, 492–502. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2010.01.021>
- Petrini, J.H.J., Stracker, T.H., 2003. The cellular response to DNA double-strand breaks: defining the sensors and mediators. *Trends Cell Biol.* 13, 458–462. [https://doi.org/10.1016/s0962-8924\(03\)00170-3](https://doi.org/10.1016/s0962-8924(03)00170-3)
- Quinet, A., Lemaçon, D., Vindigni, A., 2017. Replication Fork Reversal: Players and Guardians. *Molecular Cell* 68, 830–833. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2017.11.022>
- Ragamin, A., Yigit, G., Bousset, K., Beleggia, F., Verheijen, F.W., Wit, M.Y., Strom, T.M., Dörk, T., Wollnik, B., Mancini, G.M.S., 2020. Human RAD50 deficiency: Confirmation of a distinctive phenotype. *Am J Med Genet* 182, 1378–1386. <https://doi.org/10.1002/ajmg.a.61570>
- Rahman, S., Canny, M.D., Buschmann, T.A., Latham, M.P., 2020. A Survey of Reported Disease-Related Mutations in the MRE11-RAD50-NBS1 Complex. *Cells* 9. <https://doi.org/10.3390/cells9071678>
- Ranganathan, V., Heine, W.F., Ciccone, D.N., Rudolph, K.L., Wu, X., Chang, S., Hai, H., Ahearn, I.M., Livingston, D.M., Resnick, I., Rosen, F., Seemanova, E., Jarolim, P., DePinho, R.A., Weaver, D.T., 2001. Rescue of a telomere length defect of Nijmegen breakage syndrome cells requires NBS and telomerase catalytic subunit. *Curr. Biol.* 11, 962–966. [https://doi.org/10.1016/s0960-9822\(01\)00267-6](https://doi.org/10.1016/s0960-9822(01)00267-6)
- Ray Chaudhuri, A., Callen, E., Ding, X., Gogola, E., Duarte, A.A., Lee, J.-E., Wong, N., Lafarga, V., Calvo, J.A., Panzarino, N.J., John, S., Day, A., Crespo, A.V., Shen, B., Starnes, L.M., de Ruiter, J.R., Daniel,

- J.A., Konstantinopoulos, P.A., Cortez, D., Cantor, S.B., Fernandez-Capetillo, O., Ge, K., Jonkers, J., Rottenberg, S., Sharan, S.K., Nussenzweig, A., 2016. Replication fork stability confers chemoresistance in BRCA-deficient cells. *Nature* 535, 382–387. <https://doi.org/10.1038/nature18325>
- Reindl, S., Ghosh, A., Williams, G.J., Lassak, K., Neiner, T., Henche, A.-L., Albers, S.-V., Tainer, J.A., 2013. Insights into Flh1 functions in archaeal motor assembly and motility from structures, conformations, and genetics. *Mol. Cell* 49, 1069–1082. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2013.01.014>
- Rojowska, A., Lammens, K., Seifert, F.U., Drenth, C., Feldmann, H., Hopfner, K.-P., 2014. Structure of the Rad50 DNA double-strand break repair protein in complex with DNA. *EMBO J* 33, 2847–2859. <https://doi.org/10.15252/embj.201488889>
- Rooney, S., Sekiguchi, J., Whitlow, S., Eckersdorff, M., Manis, J.P., Lee, C., Ferguson, D.O., Alt, F.W., 2004. Artemis and p53 cooperate to suppress oncogenic N-myc amplification in progenitor B cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 2410–2415. <https://doi.org/10.1073/pnas.0308757101>
- Roset, R., Inagaki, A., Hohl, M., Brenet, F., Lafrance-Vanasse, J., Lange, J., Scandura, J.M., Tainer, J.A., Keeney, S., Petrini, J.H.J., 2014. The Rad50 hook domain regulates DNA damage signaling and tumorigenesis. *Genes Dev.* 28, 451–462. <https://doi.org/10.1101/gad.236745.113>
- Roth, S., Rottach, A., Lotz-Havla, A.S., Laux, V., Muschawek, A., Gersting, S.W., Muntau, A.C., Hopfner, K.-P., Jin, L., Vanness, K., Petrini, J.H.J., Drexler, I., Leonhardt, H., Ruland, J., 2014. Rad50-CARD9 interactions link cytosolic DNA sensing to IL-1 β production. *Nat Immunol* 15, 538–545. <https://doi.org/10.1038/ni.2888>
- Sallmyr, A., Tomkinson, A.E., 2018. Repair of DNA double-strand breaks by mammalian alternative end-joining pathways. *J Biol Chem* 293, 10536–10546. <https://doi.org/10.1074/jbc.TM117.000375>
- San Filippo, J., Sung, P., Klein, H., 2008. Mechanism of eukaryotic homologous recombination. *Annu. Rev. Biochem.* 77, 229–257. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.77.061306.125255>
- Sartori, A.A., Lukas, C., Coates, J., Mistrik, M., Fu, S., Bartek, J., Baer, R., Lukas, J., Jackson, S.P., 2007. Human CtIP promotes DNA end resection. *Nature* 450, 509–514. <https://doi.org/10.1038/nature06337>
- Schiller, C.B., Lammens, K., Guerini, I., Cordes, B., Feldmann, H., Schlauderer, F., Möckel, C., Schele, A., Strässer, K., Jackson, S.P., Hopfner, K.-P., 2012. Structure of Mre11–Nbs1 complex yields insights into ataxia-telangiectasia-like disease mutations and DNA damage signaling. *Nat Struct Mol Biol* 19, 693–700. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2323>
- Schoenaker, M.H.D., Henriët, S.S., Zonderland, J., van Deuren, M., Pan-Hammarström, Q., Posthumus-van Sluijs, S.J., Pico-Knijnenburg, I., Weemaes, C.M.R., IJspeert, H., 2018. Immunodeficiency in Bloom’s Syndrome. *J Clin Immunol* 38, 35–44. <https://doi.org/10.1007/s10875-017-0454-y>
- Scully, R., Panday, A., Elango, R., Willis, N.A., 2019. DNA double-strand break repair-pathway choice in somatic mammalian cells. *Nat Rev Mol Cell Biol* 20, 698–714. <https://doi.org/10.1038/s41580-019-0152-0>
- Seifert, F.U., Lammens, K., Stoehr, G., Kessler, B., Hopfner, K., 2016. Structural mechanism of ATP-dependent DNA binding and DNA end bridging by eukaryotic Rad50. *EMBO J* 35, 759–772. <https://doi.org/10.15252/embj.201592934>
- Sfeir, A., Kosiyaatrakul, S.T., Hockemeyer, D., MacRae, S.L., Karlseder, J., Schildkraut, C.L., de Lange, T., 2009. Mammalian telomeres resemble fragile sites and require TRF1 for efficient replication. *Cell* 138, 90–103. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.06.021>
- Sharples, G.J., Leach, D.R., 1995. Structural and functional similarities between the SbcCD proteins of *Escherichia coli* and the RAD50 and MRE11 (RAD32) recombination and repair proteins of yeast. *Mol. Microbiol.* 17, 1215–1217. https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1995.mmi_17061215_1.x
- Shibata, A., Moiani, D., Arvai, A.S., Perry, J., Harding, S.M., Genois, M.-M., Maity, R., van Rossum-Fikkert, S., Kertokallio, A., Romoli, F., Ismail, A., Ismalaj, E., Petricci, E., Neale, M.J., Bristow, R.G., Masson, J.-Y., Wyman, C., Jeggo, P.A., Tainer, J.A., 2014. DNA double-strand break repair pathway choice is directed by distinct MRE11 nuclease activities. *Mol. Cell* 53, 7–18. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2013.11.003>
- Shippen-Lentz, D., Blackburn, E.H., 1990. Functional evidence for an RNA template in telomerase. *Science* 247, 546–552. <https://doi.org/10.1126/science.1689074>
- Situ, Y., Chung, L., Lee, C.S., Ho, V., 2019. MRN (MRE11-RAD50-NBS1) Complex in Human Cancer and Prognostic Implications in Colorectal Cancer. *Int J Mol Sci* 20. <https://doi.org/10.3390/ijms20040816>
- Stewart, G.S., Maser, R.S., Stankovic, T., Bressan, D.A., Kaplan, M.I., Jaspers, N.G., Raams, A., Byrd, P.J., Petrini, J.H., Taylor, A.M., 1999. The DNA double-strand break repair gene hMRE11 is mutated in individuals with an ataxia-telangiectasia-like disorder. *Cell* 99, 577–587. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)81547-0](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)81547-0)
- Stracker, T.H., Carson, C.T., Weitzman, M.D., 2002. Adenovirus oncoproteins inactivate the Mre11-Rad50-NBS1 DNA repair complex. *Nature* 418, 348–352. <https://doi.org/10.1038/nature00863>
- Stracker, T.H., Petrini, J.H.J., 2011. The MRE11 complex: starting from the ends. *Nat Rev Mol Cell Biol* 12,

- 90–103. <https://doi.org/10.1038/nrm3047>
- Stucki, M., Clapperton, J.A., Mohammad, D., Yaffe, M.B., Smerdon, S.J., Jackson, S.P., 2005. MDC1 directly binds phosphorylated histone H2AX to regulate cellular responses to DNA double-strand breaks. *Cell* 123, 1213–1226. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.09.038>
- Sung, S., Li, F., Park, Y.B., Kim, J.S., Kim, A.-K., Song, O.-K., Kim, J., Che, J., Lee, S.E., Cho, Y., 2014. DNA end recognition by the Mre11 nuclease dimer: insights into resection and repair of damaged DNA. *EMBO J.* 33, 2422–2435. <https://doi.org/10.15252/embj.201488299>
- Syed, A., Tainer, J.A., 2018. The MRE11–RAD50–NBS1 Complex Conducts the Orchestration of Damage Signaling and Outcomes to Stress in DNA Replication and Repair. *Annual Review of Biochemistry* 87, null. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-062917-012415>
- Syeda, A.H., Hawkins, M., McGlynn, P., 2014. Recombination and Replication. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 6. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a016550>
- Symington, L.S., Gautier, J., 2011. Double-Strand Break End Resection and Repair Pathway Choice. *Annual Review of Genetics* 45, 247–271. <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-110410-132435>
- Takata, H., Tanaka, Y., Matsuura, A., 2005. Late S phase-specific recruitment of Mre11 complex triggers hierarchical assembly of telomere replication proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell* 17, 573–583. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2005.01.014>
- Tatebe, H., Lim, C.T., Konno, H., Shiozaki, K., Shinohara, A., Uchihashi, T., Furukohri, A., 2020. Rad50 zinc hook functions as a constitutive dimerization module interchangeable with SMC hinge. *Nat Commun* 11, 370. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-14025-0>
- Teixeira-Silva, A., Ait Saada, A., Hardy, J., Iraqui, I., Nocente, M.C., Fréon, K., Lambert, S.A.E., 2017. The end-joining factor Ku acts in the end-resection of double strand break-free arrested replication forks. *Nature Communications* 8, 1982. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-02144-5>
- Terao, C., Suzuki, A., Momozawa, Y., Akiyama, M., Ishigaki, K., Yamamoto, K., Matsuda, K., Murakami, Y., McCarroll, S.A., Kubo, M., Loh, P.-R., Kamatani, Y., 2020. Chromosomal alterations among age-related haematopoietic clones in Japan. *Nature* 584, 130–135. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2426-2>
- Trujillo, K.M., Sung, P., 2001. DNA structure-specific nuclease activities in the *Saccharomyces cerevisiae* Rad50*Mre11 complex. *J. Biol. Chem.* 276, 35458–35464. <https://doi.org/10.1074/jbc.M105482200>
- Uchisaka, N., Takahashi, N., Sato, M., Kikuchi, A., Mochizuki, S., Imai, K., Nonoyama, S., Ohara, O., Watanabe, F., Mizutani, S., Hanada, R., Morio, T., 2009. Two brothers with ataxia-telangiectasia-like disorder with lung adenocarcinoma. *J. Pediatr.* 155, 435–438. <https://doi.org/10.1016/j.jpeds.2009.02.037>
- van der Linden, E., Sanchez, H., Kinoshita, E., Kanaar, R., Wyman, C., 2009. RAD50 and NBS1 form a stable complex functional in DNA binding and tethering. *Nucleic Acids Res.* 37, 1580–1588. <https://doi.org/10.1093/nar/gkn1072>
- Van Komen, S., Petukhova, G., Sigurdsson, S., Stratton, S., Sung, P., 2000. Superhelicity-Driven Homologous DNA Pairing by Yeast Recombination Factors Rad51 and Rad54. *Molecular Cell* 6, 563–572. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(00\)00055-1](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(00)00055-1)
- van Noort, J., van der Heijden, T., de Jager, M., Wyman, C., Kanaar, R., Dekker, C., 2003. The coiled-coil of the human Rad50 DNA repair protein contains specific segments of increased flexibility. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100, 7581–7586. <https://doi.org/10.1073/pnas.1330706100>
- Vazquez Nunez, R., Ruiz Avila, L.B., Gruber, S., 2019. Transient DNA Occupancy of the SMC Interarm Space in Prokaryotic Condensin. *Mol. Cell* 75, 209–223.e6. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2019.05.001>
- Waltes, R., Kalb, R., Gatei, M., Kijas, A.W., Stumm, M., Soback, A., Wieland, B., Varon, R., Lerenthal, Y., Lavin, M.F., Schindler, D., Dörk, T., 2009. Human RAD50 Deficiency in a Nijmegen Breakage Syndrome-like Disorder. *Am J Hum Genet* 84, 605–616. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2009.04.010>
- Wang, Q., Goldstein, M., Alexander, P., Wakeman, T.P., Sun, T., Feng, J., Lou, Z., Kastan, M.B., Wang, X.-F., 2014. Rad17 recruits the MRE11–RAD50–NBS1 complex to regulate the cellular response to DNA double-strand breaks. *The EMBO Journal* 33, 862–877. <https://doi.org/10.1002/embj.201386064>
- Wang, W., Daley, J.M., Kwon, Y., Krasner, D.S., Sung, P., 2017. Plasticity of the Mre11–Rad50–Xrs2–Sae2 nuclease ensemble in the processing of DNA-bound obstacles. *Genes Dev.* 31, 2331–2336. <https://doi.org/10.1101/gad.307900.117>
- Wang, Y., Gudikote, J., Giri, U., Yan, J., Deng, W., Ye, R., Jiang, W., Li, N., Hobbs, B.P., Wang, J., Swisher, S.G., Fujimoto, J., Wistuba, I.I., Komaki, R., Heymach, J.V., Lin, S.H., 2018. RAD50 Expression Is Associated with Poor Clinical Outcomes after Radiotherapy for Resected Non-small Cell Lung Cancer. *Clin. Cancer Res.* 24, 341–350. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-17-1455>
- Weemaes, C.M., Hustinx, T.W., Scheres, J.M., van Munster, P.J., Bakkeren, J.A., Taalman, R.D., 1981. A new chromosomal instability disorder: the Nijmegen breakage syndrome. *Acta Paediatr Scand* 70, 557–564. <https://doi.org/10.1111/j.1651-2227.1981.tb05740.x>

- Williams, G.J., Lees-Miller, S.P., Tainer, J.A., 2010. Mre11-Rad50-Nbs1 conformations and the control of sensing, signaling, and effector responses at DNA double-strand breaks. *DNA Repair (Amst)* 9, 1299–1306. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2010.10.001>
- Williams, G.J., Williams, R.S., Williams, J.S., Moncalian, G., Arvai, A.S., Limbo, O., Guenther, G., SilDas, S., Hammel, M., Russell, P., Tainer, J.A., 2011. ABC ATPase signature helices in Rad50 link nucleotide state to Mre11 interface for DNA repair. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 18, 423–431. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2038>
- Williams, R.S., Moncalian, G., Williams, J.S., Yamada, Y., Limbo, O., Shin, D.S., Grocock, L.M., Cahill, D., Hitomi, C., Guenther, G., Moiani, D., Carney, J.P., Russell, P., Tainer, J.A., 2008. Mre11 Dimers Coordinate DNA End Bridging and Nuclease Processing in Double-Strand-Break Repair. *Cell* 135, 97–109. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.08.017>
- Wiltzius, J.J.W., Hohl, M., Fleming, J.C., Petrini, J.H.J., 2005. The Rad50 hook domain is a critical determinant of Mre11 complex functions. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 12, 403–407. <https://doi.org/10.1038/nsmb928>
- Wright, W.D., Shah, S.S., Heyer, W.-D., 2018. Homologous recombination and the repair of DNA double-strand breaks. *J Biol Chem* 293, 10524–10535. <https://doi.org/10.1074/jbc.TM118.000372>
- Wu, X., 2004. SV40 T antigen interacts with Nbs1 to disrupt DNA replication control. *Genes & Development* 18, 1305–1316. <https://doi.org/10.1101/gad.1182804>
- Xiao, Y., Weaver, D.T., 1997. Conditional gene targeted deletion by Cre recombinase demonstrates the requirement for the double-strand break repair Mre11 protein in murine embryonic stem cells. *Nucleic Acids Res.* 25, 2985–2991. <https://doi.org/10.1093/nar/25.15.2985>
- Yang, H., Li, Q., Fan, J., Holloman, W.K., Pavletich, N.P., 2005. The BRCA2 homologue Brh2 nucleates RAD51 filament formation at a dsDNA–ssDNA junction. *Nature* 433, 653–657. <https://doi.org/10.1038/nature03234>
- Yang, Y.-G., Frappart, P.-O., Frappart, L., Wang, Z.-Q., Tong, W.-M., 2006. A novel function of DNA repair molecule Nbs1 in terminal differentiation of the lens fibre cells and cataractogenesis. *DNA Repair* 5, 885–893. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2006.05.004>
- Ye, M., Graf, T., 2007. Early decisions in lymphoid development. *Current Opinion in Immunology* 19, 123–128. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2007.02.007>
- You, Z., Shi, L.Z., Zhu, Q., Wu, P., Zhang, Y.-W., Basilio, A., Tonnu, N., Verma, I.M., Berns, M.W., Hunter, T., 2009. CtIP links DNA double-strand break sensing to resection. *Mol. Cell* 36, 954–969. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2009.12.002>
- Yuan, S.-S.F., Hou, M.-F., Hsieh, Y.-C., Huang, C.-Y., Lee, Y.-C., Chen, Y.-J., Lo, S., 2012. Role of MRE11 in cell proliferation, tumor invasion, and DNA repair in breast cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* 104, 1485–1502. <https://doi.org/10.1093/jnci/djs355>
- Zabolotnaya, E., Mela, I., Williamson, M.J., Bray, S.M., Yau, S.K., Papatziadou, D., Edwardson, J.M., Robinson, N.P., Henderson, R.M., 2020. Modes of action of the archaeal Mre11/Rad50 DNA-repair complex revealed by fast-scan atomic force microscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 117, 14936–14947. <https://doi.org/10.1073/pnas.1915598117>
- Zellweger, R., Dalcher, D., Mutreja, K., Berti, M., Schmid, J.A., Herrador, R., Vindigni, A., Lopes, M., 2015. Rad51-mediated replication fork reversal is a global response to genotoxic treatments in human cells. *Journal of Cell Biology* 208, 563–579. <https://doi.org/10.1083/jcb.201406099>
- Zhao, W., Steinfeld, J.B., Liang, F., Chen, X., Maranon, D.G., Ma, C.J., Kwon, Y., Rao, T., Wang, W., Chen, S., Song, X., Deng, Y., Jimenez-Sainz, J., Lu, L., Jensen, R.B., Xiong, Y., Kupfer, G.M., Wiese, C., Greene, E.C., Sung, P., 2017. Promotion of RAD51-mediated homologous DNA pairing by BRCA1-BARD1. *Nature* 550, 360–365. <https://doi.org/10.1038/nature24060>
- Zhong, Z.-H., Jiang, W.-Q., Cesare, A.J., Neumann, A.A., Wadhwa, R., Reddel, R.R., 2007. Disruption of Telomere Maintenance by Depletion of the MRE11/RAD50/NBS1 Complex in Cells That Use Alternative Lengthening of Telomeres. *J. Biol. Chem.* 282, 29314–29322. <https://doi.org/10.1074/jbc.M701413200>
- Zhu, J., Petersen, S., Tessarollo, L., Nussenzweig, A., 2001. Targeted disruption of the Nijmegen breakage syndrome gene NBS1 leads to early embryonic lethality in mice. *Curr. Biol.* 11, 105–109. [https://doi.org/10.1016/s0960-9822\(01\)00019-7](https://doi.org/10.1016/s0960-9822(01)00019-7)
- Zhu, M., Zhao, H., Limbo, O., Russell, P., 2018. Mre11 complex links sister chromatids to promote repair of a collapsed replication fork. *Proc Natl Acad Sci USA* 115, 8793–8798. <https://doi.org/10.1073/pnas.1808189115>
- Zhu, X.D., Küster, B., Mann, M., Petrini, J.H., de Lange, T., 2000. Cell-cycle-regulated association of RAD50/MRE11/NBS1 with TRF2 and human telomeres. *Nat. Genet.* 25, 347–352. <https://doi.org/10.1038/77139>

TABLE DES ILLUSTRATIONS

L'ensemble des figures a été réalisé au moyen du site BioRender.com

- Figure 1 : Dommages à l'ADN et voies de réparation impliquées.
Figure 2 : La jonction d'extrémités non homologues (Non Homologous End Joining – NHEJ).
Figure 3 : Mécanisme de jonction d'extrémités non homologues alternatif (a-NHEJ).
Figure 4 : La recombinaison homologue.
Figure 5 : Protection des fourches de réplication par les acteurs de la recombinaison homologue.
Figure 6 : Redémarrage d'une fourche de réplication dysfonctionnelle.
Figure 7 : Prise en charge des lésions post répliquatives.
Figure 8 : Prise en charge des cassures simple brin sur un des brins parentaux durant la réplication.
Figure 9 : Le complexe MRN et stress cellulaire.
Figure 10 : Organisation du complexe MRN.
Figure 11 : La protéine MRE11.
Figure 12 : Les différentes conformations de MRE11.
Figure 13 : La protéine NBS1.
Figure 14 : La protéine RAD50.
Figure 15 : Organisation du domaine en bobine enroulée de RAD50.
Figure 16 : Homodimérisation de RAD50.
Figure 17 : Les possibles conformations du complexe MRN après analyse par HS-AFM.
Figure 18 : Changements conformationnels de Rad50 et hydrolyse de l'ATP en présence d'ADN.
Figure 19 : Activités du complexe MRN.
Figure 20 : Le peignage moléculaire.
Figure 21 : Code Morse Génétique.
Figure 22 : Analyse des paramètres de réplication par peignage moléculaire.
Figure 23 : Technique du SMART.
Figure 24 : Analyse de la résection au cours de la réplication après induction d'un stress répliquatif.
Figure 25 : Test de la voie NHEJ.
Figure 26 : Analyse du TCR α par la technique de PROMIDIS α .
Figure 27 : Exons ciblés pour la génération du modèle murin *RAD50*^{E1035 Δ /-}.
Figure 28 : Analyses de métaphases dans les cellules du patient P1.
Figure 29 : Western Blot FANCD2.
Figure 30 : Analyse des foyers 53BP1 dans les cellules du patient avant et après traitement à la phléomycine.
Figure 31 : Utilisation du NHEJ et du MMEJ pour la réparation de plasmides coupés.
Figure 32 : Analyse PROMIDIS α du TCR α .
Figure 33 : SMART sur des lignées T Jurkat contrôle et 53BP1 KO.
Figure 34 : SMART sur fibroblastes.
Figure 35 : Analyse des foyers Ku80.
Figure 36 : Immunophénotypage des souris *Rad50*^{E1035 Δ} .
Figure 37 : Tests de sensibilité après délétion d'une heptade du domaine en bobine enroulée de rad50.

Figure 38 : Analyse de la sporulation et de la viabilité des spores des souches $rad50^{E1042\Delta}$ homozygotes diploïdes.
Figure 39 : Test de l'effet dominant négatif de la mutation $RAD50^{E1035\Delta}$.
Figure 40 : Une mutation séparation de fonction.
Figure 41 : Modèle proposé de l'impact de la mutation $RAD50^{E1035\Delta}$ sur l'activité nucléasique du complexe MRN.

RESUME

Titre : Identification et analyse d'une mutation pathogénique séparation de fonction de RAD50.

Le complexe MRN (MRE11-RAD50-NBS1) est un des acteurs centraux de la réparation des cassures double brin de l'ADN. Nous avons identifié un patient présentant un retard du développement associé à une insuffisance médullaire et porteur de mutations bialléliques du gène *RAD50*. La première mutation conduit à un allèle nul tandis que la seconde (notée *RAD50*^{E1035Δ}) entraîne l'expression d'une protéine ayant perdu un unique résidu dans une des heptades répétées du domaine en bobine enroulée de RAD50. Une analyse phénotypique exhaustive démontre que *RAD50*^{E1035Δ} représente une mutation séparation de fonction qui perturbe les fonctions du complexe MRN garantissant la réparation, la réplication et la résection de l'ADN, sans pour autant affecter sa capacité d'activer ATM. Les résultats obtenus, confirmés par l'utilisation de protéines recombinantes purifiées, suggèrent que c'est l'activité nucléasique de MRE11 qui est affectée. L'expression ectopique de la forme sauvage de la protéine RAD50 dans les cellules du patient restaure les capacités de réparation et de réplication montrant un lien direct entre le phénotype observé et la mutation de *RAD50* portée par le patient. La mutation correspondante chez *Saccharomyces cerevisiae* entraîne un défaut de réparation et d'activation de la voie Tel1 (ATM) thermosensible extrêmement sévère. Cette étude démontre l'importance du domaine en bobine enroulée de RAD50 pour garantir la régulation de l'activité de résection de MRE11 au sein du complexe MRN.

Mots clefs : Recombinaison homologue, complexe MRN, RAD50, peignage moléculaire.