



Universidad Autónoma de Madrid

Facultad de Ciencias

Departamento de Biología Molecular

**ANÁLISIS DE FACTORES IMPLICADOS EN
LA RESPUESTA CELULAR AL DAÑO EN EL
DNA DURANTE LA REPLICACIÓN
CROMOSÓMICA EN *Saccharomyces cerevisiae***

TESIS DOCTORAL

María Victoria Vázquez Sarrión

Madrid, 2012



Universidad Autónoma de Madrid

Facultad de Ciencias

Departamento de Biología Molecular

**ANÁLISIS DE FACTORES IMPLICADOS EN
LA RESPUESTA CELULAR AL DAÑO EN EL
DNA DURANTE LA REPLICACIÓN
CROMOSÓMICA EN *Saccharomyces cerevisiae***

Memoria presentada por la Lda. en Biología María Victoria Vázquez Sarrión para optar al grado de Doctora en Ciencias por la Universidad Autónoma de Madrid.

Madrid, 2012

El trabajo recogido en esta memoria se ha realizado en el Centro de Biología Molecular “Severo Ochoa” (CSIC-UAM), bajo la dirección del Dr. José Antonio Tercero Orduña. Para su realización se contó con una beca del Programa Nacional de Formación de Profesorado Universitario.

A mis Padres

A Fran

*Siempre ten presente que la piel se arruga,
el pelo se vuelve blanco, los días se convierten en años...*

*Pero lo importante no cambia,
tu fuerza y tu convicción no tienen edad.*

*Tu espíritu es el plumero de cualquier telaraña.
Detrás de cada línea de llegada, hay una de partida.*

Detrás de cada logro, hay otro desafío.

Mientras estés viva, siéntete viva.

Si extrañas lo que hacías, vuelve a hacerlo.

No vivas de fotos amarillas...

Sigue aunque todos esperen que abandones.

No dejes que se oxide el hierro que hay en ti.

Haz que en vez de lástima, te tengan respeto.

Cuando por los años no puedas correr, trota.

Cuando no puedas trotar, camina.

Cuando no puedas caminar, usa el bastón...

¡Pero nunca te detengas!

Madre Teresa de Calcuta

Agradecimientos

Quisiera reflejar mi agradecimiento a todas aquellas personas que han contribuido a la realización de esta tesis.

En primer lugar a mi director, el *Dr. José Antonio Tercero*, por haberme concedido la oportunidad de llevar a cabo este trabajo, por su ayuda y por todo lo que me ha enseñado durante estos años.

Al *Dr. Antonio Jiménez*, por abrirnos las puertas de su laboratorio y ayudarnos tanto en los inicios como en el desarrollo de esta tesis.

A la gente del antiguo 121, que me acogió al instante y me ayudó a emprender este trabajo. A *Blanca*, porque aunque coincidimos durante poco tiempo siempre tenía un buen consejo que dar. A *Brian*, por todos aquellos ratos compartiendo las penas y alegrías del día a día del laboratorio. A *Asun*, por su ayuda tanto dentro como fuera del laboratorio, haciéndome saber que podía contar con ella siempre. Agradecer también al personal del laboratorio de la Dra. María Fernández Lobato, en especial a *Lola* y a *Miguel*, por compartir conmigo desde una enzima hasta un rato de nicotina mientras nos poníamos al día...

A *Mónica*, por enseñarme tantas cosas y vivir aquellos ratos tan estresantes conmigo, centrífuga arriba y centrífuga abajo... A *Irene*, por su saber escuchar y compartir con nosotros un halo de optimismo y alegría diario.

Al *Dr. Luis Blanco* y al *Dr. Crisanto Gutiérrez*, porque sin su ayuda y la de toda la gente de sus laboratorios este trabajo no hubiera sido posible.

A todo el personal del laboratorio de la Dra. Margarita Salas, en especial a *Virginia*, *Lauren* y *David*, por todos esos ratos de comida y café.

Al personal de los Servicios de CBMSO, especialmente a Limpieza, Instrumentación, Citometría de Flujo, Microscopía, Almacén y Seguridad Biológica, por facilitar tanto nuestro trabajo diario.

A mis amigos del CBMSO y de los distintos centros del CSIC, por compartir conmigo tantos buenos momentos y hacerme sentir que no tenía compañeros de trabajo sino verdaderos amigos. Sin todos vosotros estos años no hubieran sido lo mismo. A *María*, por esa alegría que desprende, por su ayuda, amabilidad y comprensión, gracias *perdigoncilla*. A *Alicia*, por ser tan guapa por dentro y por fuera, por preocuparte y mostrarme siempre tu apoyo. A *Ainhoa* y *Javi*, por prestar siempre su ayuda a pesar de encontrarse a miles de kilómetros de distancia y por ser tan majos. A *Paty*, por tantos ratos de charlas y risas, haciendo más ligero el día a día con su peculiar sentido del humor. A *Tamara*, por transmitir ese espíritu único de trabajo y constancia y tener siempre un momento para todo aquél que necesite su ayuda. A *Benito*, por su enorme nobleza, y porque desde aquellas charlas del CBM en las que nos conocimos siempre has estado ahí, sabiendo escuchar y haciéndome sacar una sonrisa en cualquier momento y ante cualquier situación. A *M^a Angeles*, por estar tan cerca en los buenos y malos momentos, por su paciencia y la paz y tranquilidad que

transmite, y por aguantar tantas bromas sin poner nunca una mala cara. Y especialmente a *Vanessa*, todo lo que te diga es poco... Gracias por ayudarme desde el primer momento, tanto para hacer un experimento como para buscar piso... Por abrirme las puertas de tu casa, de tu familia y de tus amigos...Por estar siempre pendiente de todos nosotros, haciéndote sentir tan cerca a pesar de estar ahora muy lejos. Y porque poca gente tiene la suerte de contar con una amiga como tú. Gracias *fallera*, sin duda esta tesis tiene una gran parte tuya. Y gracias también a toda la gente que he conocido a través de vosotros, a Jesús, Javi, Jaime, Gaby, Lázaro y Miguel, por formar parte de esta pequeña familia a la que tanto echo de menos. Espero poder seguir compartiendo muchos buenos momentos con todos vosotros.

A las chicas de Alcalá, Ana, Lourdes y María, porque juntas iniciamos un nuevo camino en nuestras vidas, por ser como hermanas durante tantos años, cuidándonos y queriéndonos mutuamente, y porque sé que aunque hablemos de meses en meses, siempre podré contar con vosotras.

A todos mis compañeros de la Universidad de Alcalá, especialmente a *Dani, Ana, Bea Parla, Bea Teruel, Bea Heavy, Peich y Helen*, por compartir tantos momentos conmigo, todos ellos inolvidables, y por ser tan pacientes y aguantar mis épocas de desaparición.

A mis amigas de Infantes, Isabel, Luisi, Cristina C. y Cristina S, Nuria y Mireia, por estar juntas a pesar de los años, y porque aunque cada vez coincidamos menos, los ratos que nos juntamos pasan siempre volando.

A mi familia, a todos mis tíos y primos, y a mi abuela, por intentar comprender *que es lo que estoy haciendo* y tener siempre una palabra de ánimo. A mi madrina Milagros, por preguntarme siempre “¿cómo van esos ratones?” a pesar de trabajar con levaduras...

A la familia de Fran, por abrirme las puertas de su casa y hacerme sentir una más desde el primer día. A Paqui (nunca olvidaré cuando preguntaste donde podías comprar una copia del artículo...), Juan Tomás, Cristina, Bauti, Juanto y Raquel, pero especialmente a mis niñas Miriam y Alba, porque estando con vosotras uno se olvida de todo y solo contagiais inocencia y alegría.

A mis padres...tengo tanto que agradeceros que no sé por donde empezar... Gracias por acompañarme siempre en cada paso, apoyándome y ayudándome en todas mis decisiones. Gracias por transmitirme todos vuestros valores y enseñarme lo que es el esfuerzo y el trabajo, pero también el amor, la confianza y el respeto... Sé que por muchas palabras que escriba nunca serán suficientes para expresar todo lo que significais para mí. Estoy orgullosa de ser vuestra hija.

Y a Fran, por estar a mi lado durante tantos años, creciendo y madurando juntos. Gracias por tu paciencia, tu calma y tu apoyo constante, por intentar comprenderme siempre, y por aguantar tantos ratos de nervios y agobios...Gracias por transmitirme siempre ánimo y enseñarme que con esfuerzo uno puede conseguir sus propósitos. Eres todo un ejemplo de trabajo y superación. Pero sobre todo, gracias por compartir tu vida y tus sueños conmigo.

ÍNDICE

ÍNDICE	i
Abreviaturas	vii
Glosario	xiii
SUMMARY	1
INTRODUCCIÓN	5
1.1. La replicación del DNA en eucariotas	8
1.2. Fuentes y tipos de daño en el DNA.....	12
1.3. Detección y respuesta al daño en el DNA durante la replicación cromosómica: el checkpoint de la fase S	16
1.4. Mecanismos de reparación y tolerancia al daño en el material genético	19
1.5. La nucleasa Mus81-Mms4/Eme1 y su papel en la respuesta al daño en el DNA.....	27
OBJETIVOS	31
MATERIALES Y MÉTODOS	35
1. CEPAS	37
1.1. Cepas de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	37
1.2. Cepas de <i>Escherichia coli</i>	38
2. PLÁSMIDOS	38
3. OLIGONUCLEÓTIDOS	39
4. MEDIOS Y CONDICIONES DE CULTIVO.....	41
4.1. Cultivos de <i>S. cerevisiae</i>	41
4.2. Cultivos de <i>E. coli</i>	42
5. REACTIVOS Y ENZIMAS	42
6. CONSTRUCCIÓN DE CEPAS DE <i>S. cerevisiae</i>	42
7. MÉTODOS DE TRANSFORMACIÓN CELULAR	43
7.1. Transformación de <i>E. coli</i>	43
7.2. Transformación de <i>S. cerevisiae</i>	44
8. ANÁLISIS DE LA PROGRESIÓN EN EL CICLO CELULAR MEDIANTE CITOMETRÍA DE FLUJO.....	44
9. SINCRONIZACIÓN EN EL CICLO CELULAR	45
10. EXTRACCIÓN, AMPLIFICACIÓN Y DIGESTIÓN DE DNA	45
10.1. Extracción de DNA plasmídico de <i>E. coli</i>	45
10.2. Extracción de DNA genómico de <i>S. cerevisiae</i>	45
10.3. Amplificación de DNA mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	47
10.4. Digestión enzimática de DNA	47
11. ELECTROFORESIS Y TRANSFERENCIA A MEMBRANAS DE DNA.....	47
11.1. Electroforesis habitual de DNA en geles de agarosa	47
11.2. Electroforesis bidimensional en geles de agarosa.....	47
11.3. Electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE)	48
11.4. Transferencia de DNA a membranas	49
12. ENSAYO DE SUSTITUCIÓN DE ISÓTOPOS DE DENSIDAD.....	49
13. HIBRIDACIÓN DE DNA CON SONDAS RADIOACTIVAS	51
13.1. Marcaje de sondas de DNA.....	51
13.2. Hibridación de DNA	52
13.3. Deshibridación de membranas	52
14. EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS DE <i>S. cerevisiae</i>	52
15. ELECTROFORESIS DE PROTEÍNAS Y DETECCIÓN POR INMUNOBLOT	52
16. ENSAYO DE ACTIVIDAD QUINASA <i>IN SITU</i> PARA Rad53	53
17. ENSAYO DE UNIÓN DE PROTEÍNAS A CROMATINA	54
18. ENSAYOS DE SENSIBILIDAD AL TRATAMIENTO CON MMS O HU	55
19. OBSERVACIÓN DE CÉLULAS MEDIANTE MICROSCOPÍA DE FLUORESCENCIA	55
RESULTADOS	57
1. ANÁLISIS DEL PAPEL DE DIFERENTES RUTAS EN LA REPLICACIÓN CROMOSÓMICA EN CONDICIONES DE DAÑO EN EL DNA	59
1.1. La ruta de reparación por escisión de bases es esencial para la progresión de las horquillas	

de replicación a través de un DNA dañado por MMS	59
1.2. La ruta de recombinación homóloga es necesaria para la progresión eficiente de las horquillas de replicación en presencia de daño en el DNA causado por MMS	62
1.3. La progresión de las horquillas de replicación a través de un DNA dañado por alquilación es defectiva en ausencia de la ruta RAD6/RAD18 de tolerancia al daño en el material genético	64
1.4. Los efectos de la ausencia de la recombinación homóloga y de los mecanismos de tolerancia al daño en el DNA sobre la progresión de las horquillas de replicación en presencia de MMS son aditivos	66
1.5. El checkpoint de la fase S es funcional en los mutantes <i>mag1Δ</i> , <i>rad52Δ</i> y <i>rad18Δ</i>	68
1.6. Reversibilidad de los efectos del MMS durante la fase S en los mutantes <i>mag1Δ</i> , <i>rad52Δ</i> y <i>rad18Δ</i>	70
1.7. Estudio de la acumulación de las proteínas <i>Mag1</i> y <i>Rad52</i> en respuesta al daño en el DNA originado por el MMS durante la fase S.....	75
2. ESTUDIO DEL PAPEL DE LA ENDONUCLEASA <i>Mus81-Mms4</i> DE <i>S. cerevisiae</i> EN LA RESPUESTA CELULAR AL DAÑO EN EL DNA DURANTE LA FASE S DEL CICLO CELULAR	77
2.1. <i>Mus81-Mms4</i> es esencial para el mantenimiento de la viabilidad celular durante la fase S del ciclo celular cuando las células son tratadas con MMS	77
2.2. El checkpoint de la fase S es funcional en el mutante <i>mus81Δ</i>	79
2.3. La formación de las horquillas de replicación y la iniciación de la replicación del DNA en presencia de daño en el material genético es aparentemente normal en el mutante <i>mus81Δ</i>	80
2.4. La progresión de las horquillas de replicación en condiciones de daño en el DNA está afectada en ausencia de <i>Mus81</i>	82
2.5. <i>Mus81-Mms4</i> es necesaria para completar la replicación cromosómica cuando el DNA está dañado.....	84
2.6. Los efectos ocasionados por el MMS durante la fase S en ausencia de <i>Mus81-Mms4</i> son en gran medida reversibles, y la nucleasa puede actuar después de que la mayor parte de la replicación cromosómica se complete	86
2.7. <i>Mus81-Mms4</i> no es necesaria para hacer frente al estrés replicativo provocado por el tratamiento con hidroximetiluracilo en <i>S. cerevisiae</i>	90
2.8. La endonucleasa <i>Mus81-Mms4</i> no se requiere para el restablecimiento de la replicación cromosómica tras el tratamiento con hidroximetiluracilo en <i>S. cerevisiae</i>	92
2.9. <i>Mus81-Mms4</i> no sufre modificaciones postraduccionales detectables durante la fase S como consecuencia del daño en el DNA o el bloqueo de las horquillas de replicación	93
2.10. La unión del complejo <i>Mus81-Mms4</i> a la cromatina podría estar regulada en respuesta al daño en el DNA	95
2.11. La función de <i>Mus81-Mms4</i> en la respuesta al daño en el DNA durante la replicación cromosómica no está regulada por el checkpoint de la fase S en <i>S. cerevisiae</i>	96
2.12. <i>Mus81-Mms4</i> coopera con la resolvasa <i>Yen1</i> para hacer frente al daño en el DNA durante la replicación cromosómica.....	99
2.13. <i>Yen1</i> no es necesaria para hacer frente al estrés replicativo en <i>S. cerevisiae</i>	102
DISCUSIÓN	105
1. MÚLTIPLES RUTAS COOPERAN PARA HACER POSIBLE LA REPLICACIÓN CROMOSÓMICA EN PRESENCIA DE DAÑO EN EL MATERIAL GENÉTICO	107
1.1. Las rutas BER, HR y DDT permiten la replicación cromosómica en presencia de lesiones en el DNA originadas por el MMS.....	108
1.2. Desplazamiento lento de las horquillas de replicación a través de un DNA dañado	110
1.3. Reversibilidad de los efectos causados por el MMS durante la fase S en células deficientes en BER, HR o DDT	111
1.4. Replicación cromosómica en presencia de otros agentes causantes de daño exógeno en el DNA	112
2. LA NUCLEASA <i>Mus81-Mms4</i> PERMITE QUE LAS CÉLULAS COMPLETEN LA REPLICACIÓN CROMOSÓMICA Y MANTENGAN LA ESTABILIDAD DEL GENOMA CUANDO EL DNA ESTÁ DAÑADO.....	112
2.1. <i>Mus81-Mms4</i> es necesaria para mantener la viabilidad celular en respuesta al daño en el DNA durante la fase S	112
2.2. <i>Mus81-Mms4</i> contribuye a hacer posible la replicación cromosómica en condiciones de daño en el DNA.....	113
2.3. Función de <i>Mus81-Mms4</i>	114

2.4. Reversibilidad de los efectos causados por el MMS en ausencia de Mus81-Mms4 y posible regulación de esta endonucleasa	116
2.5. Cooperación de Mus81-Mms4 y de la resolvasa Yen1 en la respuesta celular al daño en el DNA durante la fase S.....	118
3. CONSIDERACIONES FINALES	119
CONCLUSIONES	121
REFERENCIAS	125

Abreviaturas

AAA+:	ATPasas asociadas con diversas actividades celulares
ACS:	Secuencia consenso del ARS
AP:	Sitioapurínico o apirimidínico
ARS:	Secuencia de replicación autónoma
ATP:	Adenosina trifosfato
BER:	Reparación por escisión de bases
BIR:	Replicación inducida por rotura
BSA:	Seroalbúmina bovina
C-terminal:	Carboxilo terminal
CDK:	Quinasa dependiente de ciclina
CPT:	Camptotecina
dCTP:	2' Deoxiciditina 5' trifosfato
DDK:	Quinasa dependiente de Dbf4
DDT:	Tolerancia al daño en el DNA
dHJ:	Doble unión de Holliday
DNA:	Ácido desoxirribonucleico
dNTPs:	Desoxinucleótidos trifosfato
dRP:	Desoxirribosa fosfato
DSB:	Rotura de doble cadena de DNA
DSBR:	Reparación de roturas de doble hebra en el DNA
DTT:	Ditiotreitol
EDTA:	Ácido etilen-diamino tetra-acético
EGTA:	Ácido etilen-glicol tetra-acético
GFP:	Proteína fluorescente verde
HEPES:	Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazina-etanosulfónico
HJ:	Estructura o unión de Holliday
HR:	Recombinación homóloga
HRP:	Peroxidasa de rábano
HU:	Hidroxiurea
Kb:	Kilobase
MMR:	Reparación de apareamientos erróneos
MMS:	Metil metano sulfonato
MOPS:	Ácido 3-(N-morfolino) propanosulfónico

N-terminal:	Amino terminal
NER:	Reparación por escisión de nucleótidos
NHEJ:	Reparación por unión de extremos no homólogos
nHJ:	Unión de Holliday con mella
OH:	Grupo hidroxilo
ORC:	Complejo de reconocimiento del origen
ORF:	Fase de lectura abierta
ORI:	Origen de replicación
P:	Grupo fosfato
PAGE:	Electroforesis en gel de poliacrilamida
Pb:	Par de bases
PCNA:	Antígeno nuclear de proliferación celular
PCR:	Reacción en cadena de la polimerasa
PEG:	Polietilenglicol
PFGE:	Electroforesis en gel de campo pulsado
PIPES:	Ácido 1,4-piperazina-dietanosulfónico
Pol:	Polimerasa
Pre-IC:	Complejo de pre-iniciación
Pre-RC:	Complejo pre-replicativo
RFB:	Barrera para las horquillas de replicación
RFC:	Factor de replicación C
RNA:	Ácido ribonucleico
RNasa:	Ribonucleasa
ROS:	Especies reactivas de oxígeno
RPA:	Proteína de replicación A
SDS-PAGE:	Electroforesis en gel de poliacrilamida y SDS
SDS:	Dodecilsulfato sódico
SDSA:	Reasociación de cadenas dependiente de síntesis
SSA:	Reasociación de cadenas sencillas
ssDNA:	DNA de cadena sencilla
SSEs:	Endonucleasas de estructura específica
TAE:	Tris/Acetato/EDTA
TBE:	Tris/Borato/EDTA

TCA:	Ácido tricloroacético
TE:	Tris/EDTA
TGS:	Tris/Glicina/SDS
TLS:	Síntesis a través de lesiones
Tm:	Temperatura de fusión
Tris:	Tris-(hidroximetil)-aminometano
UFC:	Unidad formadora de colonia
UV:	Ultravioleta

Glosario

En este trabajo se ha tratado de evitar el uso de anglicismos. Sin embargo, en los casos que se describen a continuación se ha preferido mantener el término original, bien por no existir una correspondencia adecuada en castellano o bien por un uso generalizado en el lenguaje científico.

Checkpoints: Rutas de transducción de señales que constituyen un mecanismo de control y vigilancia para la supervivencia de la célula.

Immunoblot: Se utiliza de forma habitual y es una versión en castellano del término inglés *immunoblot*. Consiste en una técnica de separación de proteínas mediante electroforesis en gel e identificación posterior de las mismas mediante su transferencia a una membrana y utilización de anticuerpos específicos.

D-loop: Estructura del DNA en forma de lazo o bucle de desplazamiento.

Flap: Extremo de cadena sencilla de DNA que sobresale de una molécula doble de DNA, generado por el desapareamiento de las cadenas tras una rotura o apareamiento incompleto de las mismas.

SUMMARY

Eukaryotic genomes are especially vulnerable during the S phase of the cell cycle, when chromosomes must be replicated. Chromosome replication is a complex process and, in addition, numerous exogenous and endogenous agents damage the DNA and interfere inevitably with the progression and stability of replication forks, challenging genome integrity. Failures to protect DNA replication forks or the inability to process stalled forks to finish chromosome duplication lead to genomic instability, a hallmark of cancer and other diseases. To cope with these problems, eukaryotic cells activate a DNA damage response that promotes the stabilization of replication forks, the repair or tolerance of DNA lesions, and the resumption of DNA synthesis after fork blocks.

In this PhD Thesis, we have analysed the contribution of several pathways and proteins to the maintenance of genome stability during chromosome replication in the presence of DNA damage, using the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae* as a model. We have shown that when the DNA template is damaged by the alkylating agent methyl methanesulfonate, base excision repair, homologous recombination and DNA damage tolerance pathways, together with a functional S-phase checkpoint, are essential for efficient progression of DNA replication forks and cell survival. In the absence of base excision repair, replication forks stall reversibly in cells exposed to MMS. This repair reaction is necessary to eliminate the DNA lesions that impede fork progression, and has to be coordinated with recombination and damage tolerance activities to avoid fork collapse and allow forks to resume and complete chromosome replication.

We have also studied the role of the conserved heterodimeric nuclease Mus81-Mms4 from *S. cerevisiae* in the response to DNA damage during chromosomal replication. We have shown that this complex is required to maintain cell viability during S phase in the presence of DNA lesions caused by MMS. Cells lacking this nuclease fail to complete chromosome replication when they are treated with this compound, which would explain the loss of cell viability under these conditions. On the contrary, Mus81-Mms4 is not required to resume DNA synthesis when forks stall due to dNTP depletion by the action of hydroxyurea. Problems originated by exposure to MMS during S phase in the absence of Mus81-Mms4 are mostly reversible after inducing the expression of this complex. Moreover, Mus81-Mms4 can work after bulk DNA synthesis and therefore its function can be uncoupled from chromosomal replication. In addition, the regulatory subunit Mms4 binds to chromatin only when the DNA is damaged, which could help to understand how this nuclease is regulated. This work also shows that the Mus81-Mms4 nuclease cooperates with the Yen1 resolvase in the response to DNA damage during S phase.

INTRODUCCIÓN

En cada ciclo de división celular, los cromosomas deben ser replicados con absoluta precisión -sin errores, en su totalidad, y solo una vez-, antes de ser segregados en la mitosis. El éxito de este proceso es esencial para la viabilidad celular, y los fallos en el mismo son una de las principales causas de inestabilidad del genoma. La replicación del DNA en eucariotas se inicia a partir de múltiples orígenes de replicación que se activan de forma programada durante la fase S del ciclo celular, y tanto la iniciación de la replicación como la elongación, cuando cada horquilla de replicación replica varias kilobases de DNA hasta encontrarse con otra horquilla procedente del origen activo más cercano, están estrictamente reguladas (Sclafani y Holzen, 2007; Masai y col., 2010).

Además de los errores inherentes al proceso de replicación cromosómica, debidos a su elevada complejidad, las células deben hacer frente durante el mismo a la presencia frecuente de daño en el material genético y al estrés replicativo, causados de forma inevitable tanto por agentes exógenos como endógenos. El daño en el DNA puede ocasionar alteraciones en su composición o en su estructura, dificultando enormemente la capacidad de duplicar correctamente el genoma. Las lesiones en el DNA interfieren muchas veces directamente con las horquillas de replicación, generando paradas y colapsos de las mismas que pueden dar lugar a una duplicación incompleta o defectuosa del genoma, e incluso a roturas cromosómicas. La replicación del DNA puede a su vez exacerbar el daño existente, al convertir lesiones relativamente benignas, como algunas roturas de banda simple o bases modificadas, en roturas de doble cadena altamente citotóxicas o en mutaciones fijadas en las células hijas. Necesariamente, el daño en el DNA y la replicación incompleta del material genético deben ser reconocidos por las células y reparados de forma satisfactoria, siendo en caso contrario una fuente de mutaciones y de inestabilidad genómica y, consecuentemente, una causa potencial de cáncer y otras enfermedades en eucariotas superiores (Aguilera y Gómez-Gonzalez, 2008; Branzei y Foiani, 2010). Para solucionar o reducir las consecuencias de estos problemas, las células eucariotas disponen de sistemas de eliminación de sustancias tóxicas, así como de rutas que permiten la reparación y/o la tolerancia de las lesiones originadas en el DNA, y de mecanismos de vigilancia – *checkpoints*-, que detectan las perturbaciones y coordinan de algún modo la reparación del daño y el restablecimiento de la replicación con la progresión en el ciclo celular (Aguilera y Gómez-Gonzalez, 2008; Branzei y Foiani, 2008; Friedel y col., 2009; Segurado y Tercero, 2009).

Muchos de los conocimientos adquiridos sobre estos procesos han sido posibles gracias a la utilización de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* como modelo eucariótico de trabajo. Su facilidad de manipulación genética en el laboratorio, el tamaño relativamente pequeño de su genoma (aproximadamente $1,25 \times 10^7$ pb) y el conocimiento que se tiene del mismo, así como el hecho de que los mecanismos moleculares básicos estén conservados evolutivamente, han convertido a este organismo en una herramienta de trabajo extremadamente útil. Los estudios realizados en esta tesis se han llevado a cabo empleando esta levadura como modelo.

1.1. La replicación del DNA en eucariotas

La replicación del DNA en eucariotas se inicia a partir de múltiples elementos cromosómicos llamados orígenes de replicación (ORIs), cuyo número - aproximadamente 400 en levaduras- permite duplicar las grandes cantidades de DNA que componen los genomas eucarióticos en un tiempo compatible con la vida de las células. En *S. cerevisiae*, los ORIs son secuencias cortas de DNA bien definidas, a diferencia de metazoos y plantas, donde no parece haber especificidad de secuencia (Bielinsky y Gerbi, 2001; Bell y Dutta, 2002). Los orígenes de replicación dirigen la formación de complejos multiproteicos que llevarán al ensamblaje de las horquillas de replicación. Este proceso, conservado evolutivamente en sus aspectos más importantes, se inicia con la formación del complejo pre-replicativo (pre-RC, *pre-Replicative Complex*) en la fase G1 del ciclo celular, lo que requiere la unión secuencial a los orígenes de diferentes factores de replicación. Una vez formados, los pre-RCs deben ser activados por dos quinasas que dirigen la transición hacia la replicación. Este paso requiere también la unión y coordinación de factores adicionales que facilitan el desenrollamiento del DNA en el origen, y culmina con la asociación de las DNA polimerasas replicativas y la formación del replisoma, lo que permitirá el establecimiento de dos horquillas de replicación con polaridad opuesta en cada origen activo. Tras ello, se inicia la replicación del DNA, que procede bidireccionalmente desde el origen durante la fase de elongación hasta que cada horquilla encuentra otra proveniente de un origen próximo, momento en el que la duplicación de esa parte del cromosoma termina (Bell y Dutta, 2002; Sclafani y Holzen, 2007; Masai y col., 2010). En la Fig. 11 se recoge un esquema del proceso de iniciación de la replicación en organismos eucariotas, que se explica a continuación.

Los orígenes de replicación están determinados, al menos en parte, por la unión del complejo multiproteico ORC, formado por seis subunidades (Orc1-6) y muy conservado evolutivamente, que actúa como iniciador (Bell y Stillman, 1992; Bell y col., 1993; Micklem y col., 1993). ORC permanece unido a los ORIs durante todo el ciclo celular (Diffley y col., 1994), incluso en mitosis en *S. cerevisiae*, si bien en *Xenopus* y en células de mamíferos podría disociarse del DNA cuando las células separan sus cromosomas. La unión de ORC al DNA requiere que este complejo una ATP, pero no necesita su hidrólisis (Klemm y col., 1997). Durante la fase G1, ORC promueve el reclutamiento a los orígenes de la proteína Cdc6 (Liang y col., 1995), miembro de la familia AAA⁺ de ATPasas, que requiere unir ATP para asociarse al mismo (Speck y col., 2005). A continuación, la hidrólisis de ATP llevada a cabo por ORC y Cdc6 hace posible la unión de la proteína Cdt1 a los ORIs y posteriormente de la helicasa Mcm2-7, formándose así el complejo pre-replicativo (pre-RC) (Speck y col., 2005; Randell y col., 2006). La asociación de ORC, Cdc6 y Cdt1 con los orígenes es imprescindible para la unión de Mcm2-7 a los mismos (Liang y col., 1995; Cocker y col., 1996; Maiorano y col., 2000; Nishitani y col., 2000) y se conoce como *licensing* o autorización de los ORIs (Blow y Hodgson, 2002). Las seis proteínas que constituyen el complejo Mcm2-7 (Mcm2 a 7, *minichromosome-maintenance 2-7*), también son parte de la familia AAA⁺ de ATPasas, y se unen al DNA de cadena doble como dos hexámeros (Remus y Diffley, 2009). Las proteínas Mcms son necesarias a lo largo de la fase S, tanto en la iniciación como en la elongación de la replicación del DNA (Labib y

col., 2000; Forsburg, 2004), a diferencia del resto de los componentes de los pre-RCs, que no forman parte del replisoma y no se requieren para la fase de elongación de la replicación, siendo Cdc6 y Cdt1 desplazados de la cromatina una vez iniciada la replicación (Diffley, 2011).

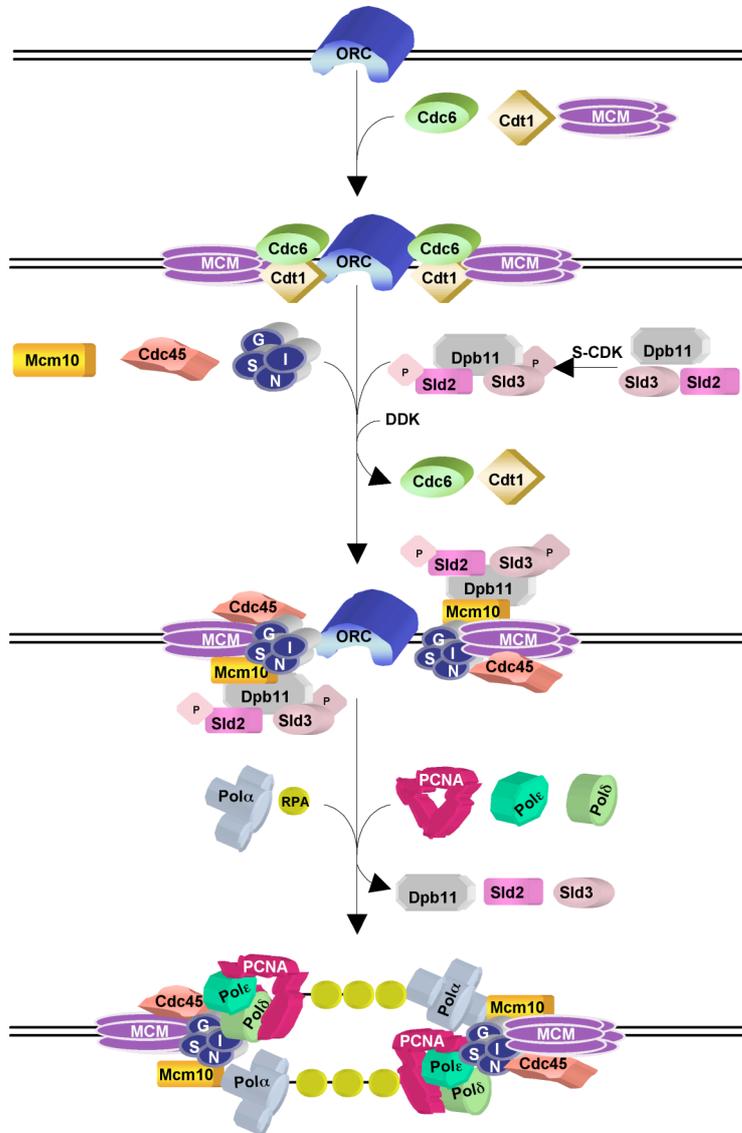


Figura II. Representación esquemática del inicio de la replicación en organismos eucariotas [Modificado de Bryant y Aves, 2011]. El proceso comienza con el reconocimiento y unión a los ORIs del complejo ORC. Tras ello, se forma el complejo pre-replicativo (pre-RC) mediante el reclutamiento secuencial al DNA de las proteínas Cdc6, Cdt1 y Mcm2-7. Las actividades CDK y DDK permiten el reclutamiento de otras proteínas, y la formación del complejo de pre-iniciación (pre-IC). Tras la activación del origen, se produce la disociación de algunas proteínas, el desenrollamiento de la doble hélice y el reclutamiento de las DNA polimerasas, PCNA-RFC y RPA para formar el replisoma, que se mueve junto con las horquillas de replicación durante el proceso de elongación de la replicación del DNA. Cada proteína o complejo proteico se representa con un color y formas únicas. Ver detalles en el texto.

El inicio de la replicación del DNA desde un ORI requiere la activación de la helicasa Mcm2-7, que permanece inactiva hasta que las células entran en la fase S, y su coordinación con el reclutamiento de una serie de proteínas que permitirán la formación del replisoma (Diffley, 2011). Para ello, se requiere que las células pasen el punto de restricción de G1 (denominado *Start* en levaduras) y se activen las quinasas CDK y Cdc7 tras la entrada en la fase S. Además, se necesita la unión transitoria de una serie de proteínas: Mcm10, Cdc45, GINS, Sld2, Sld3 y Dpb11, que se asocian al pre-RC y forman con este el complejo de preiniciación o pre-IC (*pre-Initiation Complex*). No se conoce con total precisión el orden exacto de reclutamiento de todas estas proteínas, y además existen algunas diferencias entre organismos. Por ejemplo, en *S. cerevisiae*, Cdc45 y Sld3 están presentes en los orígenes “tempranos” (ver al final de este apartado)

en la fase G1, antes de la activación de CDK/Cdc7 (Aparicio y col., 1997; Kamimura y col., 2001), mientras que en *S. pombe* la unión de Sld3 a los orígenes depende de Cdc7 y la de Cdc45 de Cdc7 y CDK (Yabuuchi y col., 2006). En cualquier caso, todas estas proteínas son necesarias para la iniciación de la replicación, si bien solo Cdc45 (Tercero y col., 2000), GINS (Gambus y col., 2006) y probablemente también Mcm10 (Merchant y col., 1997) forman parte del replisoma y se requieren durante la elongación.

En *S. cerevisiae*, Cdc28 es la única CDK (Cdk1), y conduce la progresión en la fase S junto con las ciclinas del tipo B Clb5 y Clb6. Al menos en esta levadura, CDK promueve la iniciación de la replicación mediante la fosforilación de las proteínas Sld2 y Sld3 (Treslin en eucariotas superiores), lo que a su vez facilita la unión a los orígenes de otra proteína, Dpb11 (Cut5 en *Xenopus* y *S. pombe*; TopBP1 en células de mamífero) (Tanaka y col., 2007; Zegerman y Diffley, 2007), que forma un puente entre ellas tras su fosforilación. La unión de Dpb11, junto con las actividades CDK y Cdc7, es necesaria para la unión del complejo GINS, de cuatro subunidades, que forma con Mcm2-7 y Cdc45 el macrocomplejo CMG (Cdc45-MCM-GINS), el cual puede considerarse la helicasa activa *in vivo* (Gambus y col., 2006; Moyer y col., 2006; Pacek y col., 2006). Además, la unión de Dpb11 permite el reclutamiento de la DNA polimerasa ϵ a los orígenes. CMG se ha purificado a partir de levaduras en fase S como parte de un complejo aún mayor, denominado complejo de progresión del replisoma o RPC (*replisome progression complex*), que contiene, además de Cdc45, Mcm2-7 y GINS, la chaperona de histonas FACT, los mediadores del *checkpoint* Tof1 y Mrc1, la proteína de cohesión entre cromátidas hermanas Ctf4 y la topoisomerasa I (Gambus y col., 2006). La función de algunas de estas proteínas *in vivo* no se conoce bien. La otra quinasa necesaria para la iniciación de la replicación, Cdc7, actúa junto a su subunidad reguladora Dbf4 formando el complejo Cdc7/Dbf4 o DDK (*Dbf4-dependent kinase*). Su función esencial no está clara, pero Cdc7/Dbf4 fosforila Mcm2/4/6 e induce probablemente un cambio conformacional de Mcm2-7 que facilita su activación (Lei y col., 1997; Masai y col., 2006; Sheu y Stillman, 2006).

No se conoce exactamente cómo se inicia el desenrollamiento del DNA, si bien durante el mismo se genera DNA de cadena sencilla, que se recubre por la proteína RPA, la cual lo estabiliza. Debido a su naturaleza antiparalela, el proceso de duplicación del DNA es distinto para cada una de las hebras. La cadena líder (*leading strand*) se replica de modo continuo por la DNA polimerasa ϵ , que sintetiza DNA en sentido 5' \rightarrow 3', en la misma dirección que el movimiento de la helicasa. Sin embargo, en el caso de la otra hebra, conocida como cadena retrasada (*lagging strand*), una DNA polimerasa no puede realizar la síntesis de DNA en la dirección 3' \rightarrow 5'. Para solucionar este problema, se produce una síntesis discontinua y un intercambio constante entre la DNA polimerasa α -cuya actividad primasa sintetiza pequeños fragmentos de RNA que actúan como cebadores- y la DNA polimerasa δ , más procesiva y de mayor fidelidad que DNA Pol α , que extiende la síntesis de DNA desde los mismos, dando lugar a los denominados fragmentos de Okazaki (McElhinny y col., 2008; Burgers, 2009). La DNA polimerasa α se recluta probablemente por la proteína Mcm10 (Ricke y Bielinsky, 2004; Zhu y col., 2007) y actúa como primasa tanto en la cadena líder como en la cadena retrasada (Waga y Stillman, 1994). No obstante, también se ha mostrado que Mcm10 tiene actividad primasa en *S. pombe* (Fien y Hurwitz, 2006). La eliminación de

los cebadores de RNA en la cadena retrasada necesita la acción de la RNasa H y las actividades endonucleasa y/o endonucleasa/helicasa de las proteínas Fen1 y Dna2, respectivamente. Finalmente, la DNA polimerasa δ lleva a cabo la síntesis de DNA en los huecos generados y la DNA ligasa I une los extremos (Burgers, 2009). Todo este proceso se conoce como maduración de los fragmentos de Okazaki.

La alta procesividad de las DNA polimerasas durante la síntesis de DNA requiere un factor auxiliar, PCNA (también conocido como *sliding clamp*), muy conservado estructural y funcionalmente, que pertenece a la familia de los β -clamps. PCNA es un homotrímero con forma de anillo que rodea al DNA y puede desplazarse en ambos sentidos a lo largo del mismo (Krishna y col., 1994). PCNA se une a las DNA polimerasas e impide que estas se disocien del DNA durante la replicación (Moldovan y col., 2007). La carga de PCNA al DNA se produce gracias al complejo heteropentamérico RFC (también llamado *clamp loader*), un miembro de la familia AAA⁺ de ATPasas (Majka y Burgers, 2004). RFC se une al extremo 3' del cebador y utiliza ATP para la formación de un complejo estable con PCNA y para su carga en el DNA. A su vez, la unión al DNA promueve la hidrólisis de ATP por este complejo, provocando el cierre del anillo de PCNA alrededor del mismo y la disociación de RFC del replisoma (Gomes y Burgers, 2001; Moldovan y col., 2007). Un aspecto importante es que la topología de la molécula del DNA cambia según se desenrolla durante la replicación y se crean conformaciones que deben resolverse. Así, el desenrollamiento genera superenrollamientos positivos delante de la horquilla de replicación, que son relajados por las topoisomerasas I y II (TopI y TopII), y precatenados en el DNA recién sintetizado detrás de la misma, que son eliminados por TopII (Lucas y col., 2001).

La replicación del DNA es un proceso que necesita estar extraordinariamente regulado para que la estabilidad del genoma se mantenga y la transmisión de la información genética a las células hijas tras la división celular se produzca con fidelidad. Así, la iniciación de la replicación debe estar estrictamente controlada y, una vez establecidas las horquillas de replicación, estas deben mantener su integridad ante cualquier perturbación (ver el apartado 1.3). Con respecto a la regulación de la iniciación, los orígenes de replicación deben activarse solo una vez durante la fase S para prevenir la re-replicación de cualquier parte del genoma. A su vez, en cada fase S deben activarse suficientes orígenes para que cada cromosoma se replique a su debido tiempo. Además de su papel en la activación de los complejos presentes en los ORIs para iniciar la replicación, las CDKs juegan un papel crítico en la prevención de la re-replicación, inhibiendo el ensamblaje de los pre-RCs por diferentes mecanismos (Diffley, 2011). De hecho, la formación de los pre-RCs solo tiene lugar durante la fase G1, cuando la actividad CDK es baja. Esta dualidad en la función de las CDKs contribuye a asegurar que la activación de los orígenes de replicación ocurra una sola vez durante la fase S (Diffley, 2011). La inhibición de la formación de los pre-RCs por la actividad CDK se lleva a cabo mediante mecanismos parcialmente redundantes (Diffley, 2011). Así, en *S. cerevisiae*, Cdc6 se expresa solamente en la fase G1 y se degrada una vez iniciada la replicación tras su fosforilación por Cdc28 (CDK) (Drury y col., 1997; 2000). Además, la inactivación del complejo ORC mediante la fosforilación por Cdc28 de las subunidades Orc2 y Orc6 contribuye a prevenir la re-replicación, inhibiendo probablemente el ensamblaje de los pre-RCs (Nguyen y col., 2001; Wilmes

y col., 2004). Asimismo, una vez iniciada la replicación y tras su fosforilación por Cdc28, se produce la relocalización de las proteínas Cdt1 y Mcm2-7 del núcleo al citoplasma (Hennessy y col., 1990; Labib y col., 1999; Nguyen y col., 2000; Tanaka y Diffley, 2002), lo que las mantiene fuera del primero durante el resto de la fase S, así como en G2 y M. Además, en metazoos existen mecanismos adicionales para inhibir la formación de pre-RCs: por ejemplo, Cdt1 está regulado por el inhibidor geminina y por la degradación dependiente de PCNA y Cul4 en la fase S (Wohlschlegel y col., 2000; Kim y Kipreos, 2007).

Otro aspecto importante para la regulación de la iniciación es el momento en el que los orígenes de replicación se activan. En la mayoría de los tipos celulares eucarióticos, los ORIs se activan durante la fase S de acuerdo a un programa temporal, y lo hacen a distintos tiempos a lo largo de la misma (Raghuraman y col., 2001). De forma simple, se distingue entre orígenes que se activan al principio de la fase S (orígenes de replicación “tempranos”) y orígenes que lo hacen avanzada esta (orígenes “tardíos”), si bien, considerada en su conjunto, la activación de los ORIs se produce a lo largo de toda la fase S. Aunque todos los orígenes tienen potencialmente la capacidad de activarse, dado que todos tienen unidos pre-RCs (Santocanale y Diffley, 1996), algunos no lo hacen (orígenes durmientes o inactivos) y son replicados pasivamente por horquillas provenientes de otros orígenes, y otros no se activan en un número significativo de ciclos celulares. Los factores que controlan y determinan el uso de los orígenes y el momento de activación de los mismos no son del todo conocidos, si bien el contexto cromosómico en el que un origen se sitúa parece tener un papel importante (Cayrou y col., 2010). Todas las evidencias indican en cualquier caso que el programa temporal de activación de los orígenes de replicación se establece en la fase G1 temprana, tanto en levaduras como en células de mamíferos (Wu y Gilbert, 1996; Raghuraman y col., 1997), y es importante para modular la replicación cromosómica y el comienzo y duración de la fase S.

1.2. Fuentes y tipos de daño en el DNA

El DNA es bastante estable, pero de forma constante e inevitable se encuentra expuesto a agentes y situaciones que provocan alteraciones en su composición, estructura e integridad, comprometiendo la estabilidad del genoma [Fig. I2]. Se estima, por ejemplo, que las células de mamífero pueden sufrir, al menos, unas 10000 lesiones en su material genético por día (Lindahl, 1993). Como se ha mencionado al principio de la Introducción, la existencia de lesiones es especialmente grave cuando las células intentan duplicar el material genético, ya que los problemas derivados del daño en el DNA tienden a incrementarse por el propio proceso de replicación, pudiendo provocar inestabilidad genómica, muerte celular o la fijación de mutaciones que pueden transmitirse a las células hijas tras la división celular. El origen del daño en el DNA es diverso y complejo, si bien, por simplicidad, es posible clasificarlo en endógeno, provocado por procesos del propio metabolismo celular, y medioambiental, cuando es originado por agentes exógenos a la célula.

1.2.1. Daño en el DNA endógeno

El DNA reacciona continuamente con el oxígeno y el agua, lo que produce reacciones hidrolíticas y oxidativas que dan lugar frecuentemente a múltiples lesiones “espontáneas” en el mismo, fundamentalmente desaminaciones, pérdida de bases, y modificaciones en el DNA por estrés oxidativo (Lindahl, 1993).

Las bases del DNA citosina, adenina y guanina contienen grupos aminos, y la pérdida de estos grupos –desaminación- ocurre espontáneamente y resulta en la conversión de las mismas a uracilo, hipoxantina y xantina, respectivamente. Algunos de estos productos de desaminación dan lugar a mutaciones durante la síntesis del DNA, dado que la pérdida del grupo amino cambia las propiedades de apareamiento de la base. Además de la presencia en el DNA de estas bases generadas por desaminación durante la replicación del DNA, también se pueden incorporar con una frecuencia relativamente pequeña bases como el uracilo y análogos de bases como el 5-bromouracilo. El DNA puede sufrir también pérdidas de bases mediante rotura hidrolítica del puente N-glicosídico entre la base y la desoxirribosa, que es lábil en condiciones fisiológicas. Esta rotura se produce con una frecuencia elevada y produce sitios abásicos o AP (apurínicos o apirimidínicos), muy mutagénicos y citotóxicos (Boiteux y Guillet, 2004).

El daño oxidativo es una consecuencia inevitable de la vida en una atmósfera rica en oxígeno, y se produce por la interacción del DNA con las especies reactivas del oxígeno, ROS (*reactive oxygen species*), en particular el radical hidroxilo. Estas están producidas constantemente por subproductos del metabolismo aeróbico y por la exposición a varios agentes naturales y sintéticos. El ataque de la desoxirribosa por el radical $\cdot\text{OH}$ puede producir diversas modificaciones en el DNA, como fragmentación, pérdida de bases y roturas de cadena sencilla (Bjelland y Seeberg, 2003) [Fig. I2].

Otra fuente de alteraciones en el material genético durante el metabolismo normal del DNA es la inserción incorrecta de bases durante la replicación -a pesar de la fidelidad de las polimerasas replicativas y de su capacidad correctora-, que puede producir desapareamientos entre los nucleótidos (Kunkel y Bebenek, 2000). Asimismo, la incorporación de precursores de nucleótidos dañados puede provocar errores en la replicación que pueden dar lugar a mutagénesis. Un aspecto a considerar también es el hecho de que la replicación del DNA puede contribuir a incrementar en ocasiones los efectos de algunas lesiones, como por ejemplo la conversión de una rotura de banda simple en una rotura de doble cadena.

Dentro del daño en el DNA endógeno también puede incluirse el daño programado por las células para llevar a cabo determinados procesos fisiológicos como la recombinación meiótica, la recombinación somática de los genes de las inmunoglobulinas (V(D)J) y el cambio de sexo en levaduras (*MAT switching*), en todos los cuales se generan roturas de DNA de doble cadena para hacer posible la recombinación.

Finalmente, algunas regiones del DNA constituyen “sitios frágiles” del genoma, debido a su composición o estructura, y otras poseen complejos proteína-DNA

fuertemente unidos que actúan como barreras de replicación o RFBs. Estas zonas pueden causar estrés replicativo y dificultar la duplicación del material genético, ya que pueden hacer peligrar el funcionamiento e integridad de las horquillas de replicación y provocar su colapso, ocasionando potencialmente lesiones en el DNA.

1.2.2. Daño en el DNA causado por agentes exógenos

El daño en el DNA provocado por agentes exógenos –daño medioambiental-, engloba diversas fuentes entre las que cabe destacar las radiaciones ionizantes, la luz ultravioleta y un grupo amplio de compuestos químicos que pueden causar lesiones en el material genético.

Las radiaciones ionizantes pueden originar daños al azar en prácticamente todos los componentes celulares, e inducen una gran variedad de lesiones en el DNA (Hutchinson, 1985; Frankenberg-Schwager, 1990; Ward, 1990). Las principales fuentes de este tipo de radiaciones son los rayos cósmicos y la radioactividad natural, además de las exposiciones ocasionales a otras fuentes radioactivas artificiales (rayos X, fármacos radioactivos, etc). Las radiaciones ionizantes producen daños en el DNA tanto de forma directa como indirecta. Los efectos directos resultan de la absorción directa de la energía de la radiación por el DNA, lo que lleva a la ionización de las bases o de la desoxirribosa. Los efectos indirectos se producen cuando el DNA reacciona con especies químicas formadas como consecuencia de la radiación, en gran parte por radiólisis del agua, como el radical hidroxilo. Las radiaciones ionizantes dañan las bases del DNA, formando diferentes derivados de las mismas, y pueden también originar roturas del DNA, tanto de banda simple como de cadena doble. La mayoría de los efectos letales de las radiaciones ionizantes pueden atribuirse a las roturas del DNA de cadena doble, producidas mayoritariamente por el ataque de varios radicales hidroxilo a cada una de las cadenas.

La radiación por luz ultravioleta (UV) genera principalmente enlaces covalentes como los dímeros de pirimidina ciclobutano (CPDs) y los fotoproductos 6-4 pirimidina-pirimidina (6-4PPs), así como otros fotoproductos minoritarios (Wang, 1965; Setlow, 1966; Franklin y col., 1985). Estos modifican la estructura normal del DNA y dificultan el apareamiento de las bases implicadas, perturbando la replicación (Pearlman y col., 1985; Husain y col., 1988). La radiación UV también genera lesiones asociadas normalmente con el daño oxidativo en el DNA, como el 8-oxoG, y también puede producir la unión covalente del DNA a proteínas y, ocasionalmente, la unión de dos moléculas de DNA de doble cadena [Fig. I2]. El daño inducido por la luz UV se produce por la absorción directa de fotones por las bases en el DNA y también como consecuencia de longitudes de onda en el espectro electromagnético que, aun no resultando en fotones absorbidos directamente por las bases, pueden excitar otras especies moleculares que les transfieren la energía.

La variedad de sustancias químicas que pueden dañar el DNA es muy grande. Entre ellas tienen gran importancia los agentes alquilantes, que son compuestos electrofílicos con afinidad por centros nucleofílicos en macromoléculas orgánicas como el DNA (Singer, 1975). Constituyen un grupo numeroso de compuestos, muchos de ellos carcinógenos, ampliamente usados en investigación en los laboratorios, como por

ejemplo el metil metanosulfonato (MMS), el etil metanosulfonato (EMS), la metilnitrosourea (MNU) o la N-metil-N-nitro-N-nitrosoguanidina (MNNG). Otros agentes alquilantes se utilizan en quimioterapia contra el cáncer (Ferguson y Pearson, 1996; Lawley y Phillips, 1996). Asimismo, además de los anteriores, existen agentes alquilantes en la naturaleza, como el mutágeno y carcinógeno metil clorhídrico (MeCl), e incluso alquilantes intracelulares, como la S-adenosilmetionina (SAM), un donador de grupos metilo en reacciones de metilación *in vivo* (Fry y col., 2005; Sedgwick y col., 2007; Shrivastav y col., 2010). Los agentes alquilantes pueden ser monofuncionales o bifuncionales. Los primeros tienen un único grupo reactivo que interacciona covalentemente con uno de los centros nucleofílicos en el DNA. Los bifuncionales tienen dos grupos reactivos, y cada molécula puede reaccionar potencialmente con dos sitios en el DNA.

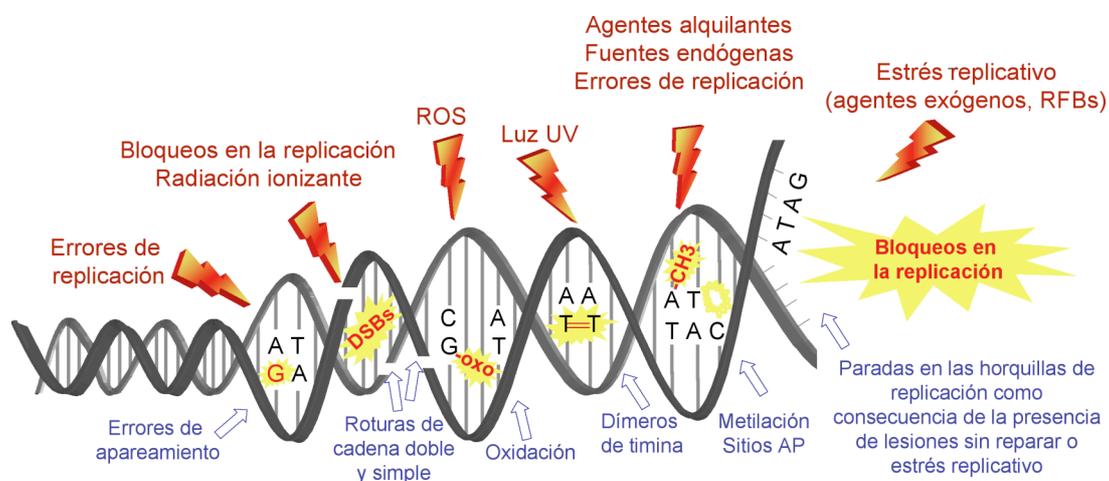


Figura I2. Esquema de las alteraciones provocadas en el DNA por diversas fuentes o agentes causantes de daño y estrés replicativo. La doble hélice del DNA se representa en color gris. Tras la exposición a determinados agentes exógenos y endógenos causantes de daño en el DNA, o a estrés replicativo (indicados en color rojo, parte superior de la figura), se producen alteraciones en la estructura y/o propiedades de apareamiento del DNA, roturas de cadena simple y doble y bloqueos o paradas en las horquillas de replicación (indicados en color azul, parte inferior de la figura).

Dentro del amplio conjunto de agentes alquilantes, el metil metanosulfonato, MMS ($C_2H_6O_3S$), es uno de los compuestos más empleados en los estudios de la respuesta celular al daño en el material genético, y se ha utilizado como modelo de agente causante de daño en el DNA en los experimentos desarrollados en esta tesis. El MMS es un alquilante monofuncional, empleado también como radiomimético, que fue utilizado en los trabajos que definieron el *checkpoint* de la fase S (Paulovich y Hartwell, 1995) y establecieron los parámetros del mismo (Tercero y Diffley, 2001). El MMS metila el DNA principalmente en la posición N7 de las desoxiguaninas y en la posición N3 de las desoxiadeninas (Beranek, 1990). Mientras que la 7-metilguanina (7meG) resultante es relativamente inocua, la 3-metiladenina (3meA) es una lesión letal que inhibe a la DNA polimerasa *in vitro*, y necesita ser reparada activamente (Larson y col., 1985).

Otros compuestos causantes de daño en el material genético son los agentes que crean uniones covalentes entre las cadenas del DNA (Singer y Kusmierek, 1982). Estos

se pueden intercalar entre dos cadenas del DNA uniéndolas covalentemente (*interstrand DNA cross-links*), o pueden unir dos regiones de DNA de la misma cadena (*intrastrand adduct*). El primer caso representa una importante clase de daño químico en el DNA, ya que impide la separación de las cadenas y puede constituir un bloqueo importante para la maquinaria de replicación. Por esta razón, agentes como el cisplatino, la mitomicina, el ácido nitroso y ciertos psoralenos fotoactivos, que pueden incluirse en este grupo, se han empleado en quimioterapia.

Otra serie de compuestos químicos son aquellos que tras una activación metabólica por enzimas específicas se convierten en formas reactivas que interactúan con centros nucleofílicos en el DNA, siendo muchos de ellos potentes mutágenos y carcinógenos (Anders y Dekant, 1994; Guengerich, 2000). Entre ellos se encuentran las aminas aromáticas, la nitrosoguanidina, las N-nitrosaminas del tabaco, los hidrocarburos aromáticos policíclicos (como el benzopireno), las aflatoxinas (micotoxinas producidas por *Aspergillus*), la 4-nitro-quinolina 1-óxido (4-NQO), e incluso hormonas como los estrógenos, que estando en exceso pueden ser hidroxilados y posteriormente oxidados convirtiéndose en productos reactivos con el DNA.

Un grupo de agentes químicos de gran importancia son los que provocan roturas en el DNA. Algunos ejemplos son el antibiótico antitumoral bleomicina, un compuesto oxidante que crea diferentes lesiones en el DNA, como sitios abásicos y un número elevado de roturas de doble cadena (Povirk, 1996), y el antibiótico zeocina, que se intercala en el DNA y origina roturas del mismo. Otros ejemplos son los inhibidores de las topoisomerasas (Ferguson y Baguley, 1996), que impiden que se finalice el proceso de rotura y unión del DNA catalizado por estas enzimas, por lo que producen numerosas roturas en el mismo. Entre estos inhibidores se encuentran la camptotecina (inhibidor de la topoisomerasa I) y el etopósido (inhibidor de la topoisomerasa II), ambos utilizados en quimioterapia.

Finalmente, existen otros compuestos que actúan como inhibidores de proteínas claves en el proceso de replicación y que, aunque propiamente no generan daño en el DNA, sí interfieren con el proceso de replicación -estrés replicativo- y, en combinación con otros factores, pueden llegar a originar lesiones en el material genético. Este es el caso de la afidilcolina (inhibidor de la DNA polimerasa) y de la hidroxurea (HU, inhibidor de la ribonucleótido reductasa). Esta última provoca el bloqueo de las horquillas de replicación y una parada en la síntesis de DNA, al causar una disminución en los niveles de dNTPs de la célula (Reichard, 1988), y ha sido empleada como modelo de agente causante de estrés replicativo en esta tesis.

1.3. Detección y respuesta al daño en el DNA durante la replicación cromosómica: el *checkpoint* de la fase S

El *checkpoint* de la fase S, o *checkpoint* de replicación, es un mecanismo de vigilancia que permite responder al daño existente en el DNA y a las perturbaciones en el proceso de replicación mediante la coordinación de una respuesta celular global necesaria para el mantenimiento de la integridad genómica (Segurado y Tercero, 2009). Consiste en una ruta de transducción de señales conservada evolutivamente (Paulovich y Hartwell, 1995; Zhou y Elledge, 2000) en la que tienen un papel central las quinasas

Mec1 y Rad53 en *S. cerevisiae*, homólogas de Rad3 y Cds1 en *S. pombe*, o de ATR y Chk2 en células humanas, respectivamente. Existe otra proteína quinasa adicional, Chk1, que tiene una función minoritaria durante la fase S en levaduras de gemación, mientras que en metazoos puede ser considerada como el análogo funcional real de Rad53 (Segurado y Tercero, 2009).

Mec1 es un miembro de la familia PI3KK (*Phosphatidyl-Inositol 3'-Kinase like Kinase*), mientras que Rad53 es una Ser/Thr/Tyr (serina-treonina-tirosina) quinasa (Stern y col., 1991). Además de Mec1, existe otra proteína de la familia PI3KK implicada en la respuesta al daño en el DNA, Tel1, homóloga de ATM en células humanas. Mec1 es el principal responsable de la activación del *checkpoint* de la fase S, participando en la respuesta a los bloqueos en la progresión de las horquillas de replicación producidos por lesiones originadas por diversos agentes genotóxicos y el estrés replicativo (Putnam y col., 2009; Segurado y Tercero, 2009). Tel1 ejerce un papel principal en respuesta a la generación de DSBs y, junto con el complejo MRX (Mre11-Rad50-Xrs2), es fundamental en el mantenimiento de la longitud de los telómeros (Lydall, 2003; Viscardi y col., 2005).

La integridad del genoma está profundamente afectada cuando el *checkpoint* es defectivo. Por ejemplo, diversos trabajos realizados con *S. cerevisiae* han mostrado que los reordenamientos cromosómicos inducidos y espontáneos se incrementan en mutantes de los componentes del *checkpoint* (Myung y col., 2001; Kolodner y col., 2002). En vertebrados, la pérdida de ATR causa roturas cromosómicas, bloqueo en el ciclo celular y letalidad embrionaria (Brown y Baltimore, 2000). En *S. cerevisiae*, los mutantes de *mec1* y *rad53* son extremadamente sensibles al tratamiento con agentes que causan diferentes formas de daño en el DNA, como el MMS, las radiaciones ionizantes o la luz UV, así como al estrés replicativo causado por HU (Weinert y col., 1994; Paulovich y Hartwell, 1995; Paulovich y col., 1998). Cuando la replicación cromosómica está afectada por la existencia de daño en el material genético o situaciones como la reducción del nivel de los dNTPs, el *checkpoint* de la fase S se activa. Su activación requiere el establecimiento de las horquillas de replicación (Lupardus y col., 2002; Stokes y col., 2002; Tercero y col., 2003) y la acumulación de regiones de DNA de cadena sencilla (ssDNA), que se forman probablemente porque la helicasa MCM continúa desenrollando el DNA, pero desacoplada de las DNA polimerasas. La proteína RPA se une entonces al ssDNA, lo que desencadena la respuesta del *checkpoint* (You y col., 2002; Zou y col., 2003).

El proceso de activación del *checkpoint* (representado esquemáticamente en la Fig. I3) se inicia con el reclutamiento del sensor Mec1/ATR y su subunidad reguladora, Ddc2 (ATRIP en células humanas) a las zonas de ssDNA-RPA en las horquillas bloqueadas (Melo y col., 2001). Mec1 fosforila entonces a Mrc1 (homóloga a Claspin en humanos), mediador que transmite la señal desde Mec1 a la quinasa efectora Rad53, clave en la cascada de señalización del *checkpoint* (Alcasabas y col., 2001), que resulta así fosforilada y activada. La activación completa de Rad53 necesita, además, la propia autofosforilación de Rad53 (Sanchez y col., 1996; Sun y col., 1996).

El proceso desencadenado coordina la replicación del DNA, la reparación del material genético y la progresión en el ciclo celular. Así, en respuesta al daño en el

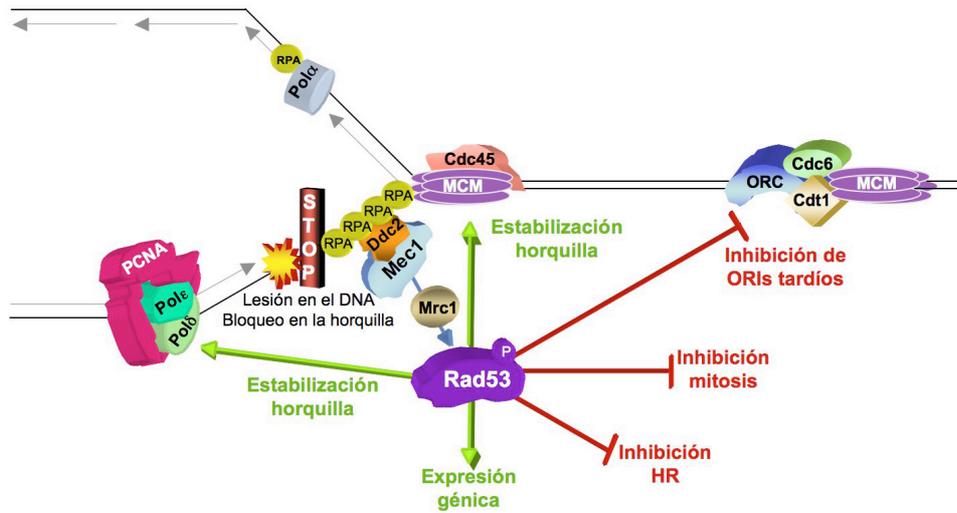


Figura I3. Representación esquemática de la respuesta del *checkpoint* de la fase S en *S. cerevisiae* [Basada en Segurado y Tercero, 2009]. Cuando las horquillas de replicación se encuentran con lesiones en el DNA o se detienen debido a la falta de dNTPs, la helicasa y las DNA polimerasas pueden desacoplarse, exponiendo amplias regiones de ssDNA que son la causa de la activación del *checkpoint* de la fase S. RPA se une a estas regiones y promueve el reclutamiento de Mec1 a las horquillas bloqueadas a través de su subunidad reguladora, Ddc2. Mec1 fosforila entonces a la proteína mediadora, Mrc1, que transmite la señal a la quinasa efectora Rad53, que es fosforilada y activada. Rad53 lleva a cabo entonces la estabilización de las horquillas de replicación, promueve la expresión de ciertos genes e inhibe la activación de los ORIs tardíos, la entrada en mitosis y la recombinación homóloga (HR) no programada.

DNA o a bloqueos en la replicación, Mec1 y Rad53 previenen la iniciación de la replicación desde los orígenes que se activan tarde en la fase S (Santocanale y Diffley, 1998; Shirahige y col., 1998; Santocanale y col., 1999) mediante la fosforilación de Dbf4 y Sld3 (Lopez-Mosqueda y col., 2010; Zegerman y Diffley, 2010). A su vez, estas quinasas ejercen un papel activo en el mantenimiento de la integridad y funcionalidad de las horquillas de replicación ya formadas (Lopes y col., 2001; Tercero y Diffley, 2001; Sogo y col., 2002) y en la reanudación de la replicación desde horquillas bloqueadas (Desany y col., 1998; Szyjka y col., 2008). Asimismo, el *checkpoint* de la fase S mantiene la integridad de las horquillas de replicación a través de zonas frágiles de los cromosomas o de replicación lenta (Casper y col., 2002; Cha y Kleckner, 2002; Admire y col., 2006; Raveendranathan y col., 2006). Además, el *checkpoint* de la fase S bloquea la progresión del ciclo celular hacia la mitosis mediante la inhibición de la elongación del huso mitótico (Allen y col., 1994), produce la inducción transcripcional de genes que codifican proteínas implicadas en la respuesta al daño en el DNA (Allen y col., 1994), y participa en la elección de las vías de reparación (Allen y col., 1994; Branzei y Foiani, 2007a; Kai y col., 2007) [Fig. I3]. De todas estas acciones, la estabilización de las horquillas de replicación es la función crucial del *checkpoint* de la fase S para garantizar la supervivencia de las células cuando el DNA está dañado (Tercero y col., 2003).

Con respecto a la función del *checkpoint* en la estabilización de las horquillas de replicación, se ha propuesto que cuando estas se bloquean por la reducción de los niveles de dNTPs, Mec1 y Rad53 mantienen la asociación del replisoma con las mismas (Cobb y col., 2003; Katou y col., 2003; Lucca y col., 2004; Cobb y col., 2005), si bien

no está completamente claro si estos resultados reflejan que el replisoma es un blanco directo del *checkpoint* o si es consecuencia de un efecto indirecto (Segurado y Tercero, 2009). Otro estudio ha mostrado que la principal acción de Rad53 para mantener la integridad de las horquillas de replicación en presencia de lesiones en el DNA sería la prevención de la actuación de la nucleasa Exo1 (Segurado y Diffley, 2008). En situaciones de estrés replicativo provocadas por el tratamiento con HU, no obstante, la actuación de Rad53 se realizaría por vías tanto Exo1-dependientes como Exo1-independientes (Cotta-Ramusino y col., 2005; Segurado y Diffley, 2008). Este último trabajo muestra a su vez que, en ausencia de Rad53, la quinasa Chk1 de *S. cerevisiae* contribuye a la estabilización de las horquillas de replicación. El mantenimiento de la integridad de las horquillas por el *checkpoint* es evidentemente complejo, y también requiere la prevención por este de la posible recombinación que podría tener en las horquillas bloqueadas, que sería potencialmente muy negativa (Meister y col., 2005; Lambert y col., 2007), y la regulación de remodeladores de la cromatina y de enzimas que modifican histonas (Morrison y col., 2007; Thaminy y col., 2007; Papamichos-Chronakis y Peterson, 2008; Shimada y col., 2008).

1.4. Mecanismos de reparación y tolerancia al daño en el material genético

Como se ha explicado en el apartado 1.2, hay una gran variedad de agentes y situaciones que provocan distintos tipos de daño en el material genético. Además de los mecanismos de vigilancia que hacen posible la detección de los problemas (*checkpoints*, apartado 1.3), las células disponen de diferentes rutas de reparación y tolerancia a las lesiones en el DNA, en general bastante conservadas en eucariotas, que les permiten hacer frente a las mismas y mantener la estabilidad del genoma. Los principales mecanismos que tienen lugar en células eucarióticas se describen a continuación, con especial atención a los conocimientos procedentes de los trabajos realizados con *S. cerevisiae*.

1.4.1. Reversión directa del daño en el DNA

Aunque la reversión directa del daño en el material genético sería el modo más simple y energéticamente más eficiente de reparar el DNA, en la mayoría de los casos la reacción de reversión no es posible por razones cinéticas o termodinámicas, y muy pocos tipos de lesiones pueden ser reparados por esta vía. En algunos casos, no obstante, esta reacción es posible. Un ejemplo es la fotorreactivación (Cook, 1970; Rupert, 1975), un sistema de reparación directa de los dímeros de pirimidina ciclobutano (CPDs) y de los fotoproductos 6-4 pirimidina-pirimidina (6-4PPs) producidos por la radiación UV. Durante este proceso, la unión covalente de las dos pirimidinas adyacentes en una misma hebra del DNA se revierte, resultando en dos monómeros de pirimidina. Esta reacción está catalizada por la fotoliasa, una enzima específica que necesita ser activada por la luz (en longitudes de onda de 300-500 nm). Otro ejemplo de reversión directa del daño en el DNA es la reparación de algunos tipos de lesiones originadas por agentes alquilantes. Entre estos mecanismos cabe destacar la reparación de O⁶-alquilguanina por la O⁶-alquilguanina-DNA-alquiltransferasa, mediante la transferencia del grupo alquilo desde el DNA a una cisteína de la proteína (Schendel y Robins, 1978; Sassanfar y Samson, 1990). También se engloba en este tipo

de reparación la llevada a cabo por AlkB (Wei y col., 1996), encontrada en casi todos los organismos, en la que la reacción catalizada por esta enzima acopla la descarboxilación oxidativa del ácido α -ceto-glutárico a la hidroxilación del grupo metilo presente en el DNA, que se descompone espontáneamente a formaldehído, restaurando la base original. Finalmente, otro ejemplo es la reversión directa de pequeñas roturas de banda simple en el DNA que puede ocurrir en algunos casos por la acción de una DNA ligasa, siempre y cuando exista un extremo 5'-fosfato y un 3'-OH (Jacobs y col., 1972).

1.4.2. Reparación de apareamientos erróneos (MMR)

Los errores en la introducción de las bases nitrogenadas que escapan a la actividad correctora de las polimerasas y las pequeñas inserciones, deleciones o bucles generados por una replicación defectuosa son reparados por el mecanismo de reparación de apareamientos erróneos (MMR: *mismatch repair*). Esta ruta funciona durante la fase S y es muy importante para conseguir la fidelidad de la replicación del DNA, evitando mutaciones. En eucariotas, MMR comienza con el reconocimiento de la lesión por los complejos heterodiméricos Msh2/Msh6 o Msh2/Msh3 (homólogos de MutS α y MutS β en procariotas), según si el apareamiento erróneo es solo puntual o implica a varios nucleótidos, respectivamente. A continuación se reclutan los complejos proteicos Mlh1/Pms1 de *S. cerevisiae* (MLH1/PMS2 en humanos) (homólogos de MutL α en procariotas), Mlh1/Mlh2 (MLH1/PMS1 en humanos) (homólogos de MutL β en procariotas) y Mlh1/Mlh3 (MutL γ en bacterias). Estos complejos interactúan con PCNA y provocan su desplazamiento junto con RFC, permitiendo el reclutamiento de la exonucleasa Exo1, que lleva a cabo el procesamiento de la lesión mediante la degradación de la cadena de DNA en dirección 5'->3'. Seguidamente, Pol δ rellena el hueco de DNA de cadena sencilla, estabilizado por RPA, y posteriormente la DNA ligasa I (Cdc9 en *S. cerevisiae*) sella la rotura para completar el proceso de reparación (Kunkel y Erie, 2005; Jiricny, 2006).

1.4.3. Reparación por escisión de bases (BER)

Las modificaciones químicas en las bases de los nucleótidos, producidas principalmente por alquilación y oxidación, así como la hidrólisis espontánea de bases, las desaminaciones y la incorporación de bases inapropiadas como el uracilo, se reparan mayoritariamente por la ruta de reparación por escisión de bases (BER: *base excision repair*) [Fig. I4]. La ruta BER se inicia por la actuación de una DNA-N-glicosilasa específica, que hidroliza el enlace N-glicosídico entre la base dañada y la desoxirribosa, generando un sitio AP (sitio apurínico o apirimidínico) en el DNA (Krokan y col., 1997). En *S. cerevisiae*, por ejemplo, la eliminación de las lesiones causadas por el MMS se inicia por una 3-metil adenina glicosilasa específica, Mag1, que rompe el enlace glicosídico entre la 3-metil adenina (3-MeA, lesión tóxica que inhibe la actuación de las polimerasas *in vitro*) y la desoxirribosa (Chen y col., 1990).

Los sitios AP, originados también por la hidrólisis espontánea de bases, son potencialmente mutagénicos y además altamente citotóxicos, debido a su capacidad de bloquear la replicación y la transcripción del DNA, y son procesados por las AP endonucleasas o por las AP liasas asociadas a ciertas glicosilasas. La principal actividad

AP endonucleasa de *S. cerevisiae* se lleva a cabo por Apn1 (Popoff y col., 1990), mientras que Apn2 sólo tiene un papel minoritario (Johnson y col., 1998). Tras la acción de la glicosilasa, Apn1 realiza el corte en el extremo 5' del sitio AP resultante, dando lugar a una rotura de banda simple (SSB) con un extremo 5'-desoxirribosa-fosfato (5'-dRP). A diferencia de las células de mamíferos, las levaduras no presentan una actividad similar a la realizada por la DNA polimerasa β , que puede actuar como polimerasa y como AP liasa en la reparación por BER cuando se elimina la base dañada y se reemplaza por un solo nucleótido (tramo corto *o short patch* de BER en células de mamífero). En *S. cerevisiae*, el grupo 3'-hidroxilo se extiende uno o varios nucleótidos por las DNA polimerasas δ o ϵ y, finalmente, la desoxirribosa abásica se elimina por la 5'-*flap* endonucleasa Rad27 para facilitar la ligación por una DNA ligasa, probablemente Cdc9 (Lindahl, 2001; Ma y col., 2008) [Fig. I4]. Rad27 es homóloga de Fen1 en células humanas, que interviene en estas en el tramo largo de BER (*long patch*), en el que se elimina un fragmento de varios nucleótidos y se sintetiza una nueva secuencia para reemplazarlo.

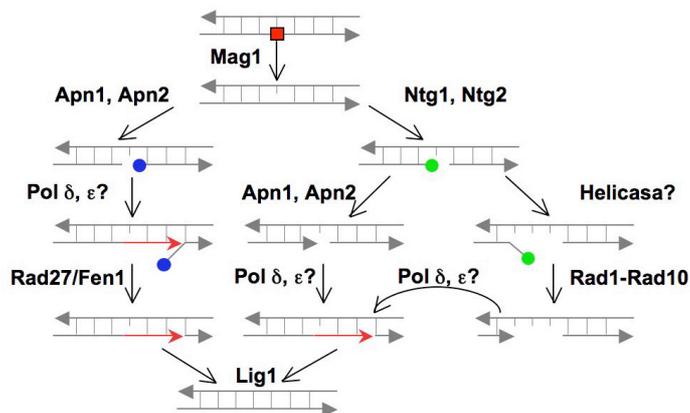


Figura I4. Esquema de la actuación de la ruta BER en *S. cerevisiae* [Basada en Ma y col., 2008]. La base alquilada se representa con un cuadrado rojo. Los extremos 5'-dRP y 3'-dRP se indican con círculos azules y verdes, respectivamente. Las puntas de flecha en las cadenas de DNA se corresponden con los extremos 3'. Las flechas rojas representan la síntesis de DNA asociada al proceso de reparación.

Esta es la ruta BER mayoritaria, pero además, una pequeña fracción de los sitios AP pueden ser procesados por las AP liasas asociadas a las DNA-N-glicosilasas Ntg1, Ntg2 u Ogg1, implicadas en la reparación del daño oxidativo en el DNA. Estas realizan un corte en el extremo 3' de dichos sitios y dan lugar a una 3'-desoxirribosa-fosfato (3'-dRP), que será posteriormente procesada por la actividad 3'-fosfodiesterasa de Apn1 y Apn2. Alternativamente, tras la posible actuación de una helicasa, se podría formar una estructura 3'-*flap* que sería procesada por la endonucleasa Rad1-Rad10 (Johnson y col., 1998; Xiao y col., 2001; Guillet y Boiteux, 2002) [Fig. I4]. La reparación se completa con la síntesis de DNA y la posterior ligación.

1.4.4. Reparación por escisión de nucleótidos (NER)

La ruta de reparación por escisión de nucleótidos (NER: *nucleotide excision repair*) es un vía bastante versátil que reconoce las distorsiones que una lesión ocasiona en el DNA, por lo que puede reparar daños diversos en el material genético. La ruta NER tiene un papel muy importante durante la fase G1 del ciclo celular, eliminando lesiones que pueden bloquear las DNA polimerasas, si bien puede actuar también en otras fases del ciclo. Entre las lesiones en el DNA más importantes que se reparan por

NER se encuentran las producidas por la luz ultravioleta (UV) y las distorsiones originadas por diferentes compuestos que provocan uniones covalentes entre cadenas del DNA. Además, la ruta NER desarrolla una función de salvaguardia en la subsanación de las lesiones causadas por oxidación y alquilación que no son reparadas por BER.

Se distinguen dos subramas de NER: reparación acoplada a transcripción, TC-NER (*Transcription-Coupled NER*), que repara el daño en el DNA que la RNA polimerasa encuentra a su paso, y reparación global del genoma, GG-NER (*Global Genome NER*), cuando NER actúa sobre lesiones en el DNA a lo largo del genoma que no se encuadran en TCR (de Laat y col., 1999). En *S. cerevisiae*, la detección de la distorsión del DNA que produce el daño se lleva a cabo por Rad4 y Rad23 (XPC y HR23B en humanos, respectivamente). Además, el reconocimiento de la lesión requiere la actuación de las proteínas Rad16/Rad7/Abf1 (en GG-NER) y Rad26/Rpb9 (en TC-NER). La demarcación de la región que debe ser escindida está determinada por el complejo TFIIH, que se recluta a continuación y está formado por 10 subunidades, entre ellas las helicasas Rad3 y Rad25 (XPD y XPB en humanos), que permiten la apertura de la doble hélice alrededor de la lesión. Posteriormente se une Rad14 (XPA en humanos), que discrimina junto con TFIIH la hebra dañada y ocasiona el desmantelamiento de los factores de reconocimiento Rad4 y Rad23, contribuyendo al reclutamiento del complejo de incisión tras la unión de RPA a la zona de DNA de cadena sencilla expuesta. La incisión se lleva a cabo por las endonucleasas Rad1-Rad10 y Rad2, pertenecientes a las familias ERCC1-XPF y XPG, respectivamente. Estas reconocen la cadena dañada y realizan cortes a ambos lados de la lesión (Rad1-Rad10 en el lado 5' y Rad2 en el lado 3'), resultando un hueco de DNA de cadena sencilla de unos 25-30 nucleótidos, que se rellena mediante nueva síntesis de DNA y se sella por una ligasa, lo que da lugar a la restauración de la doble hélice de DNA libre de daño (de Laat y col., 1999; Costa y col., 2003).

1.4.5. Reparación de roturas de doble cadena (DSB)

Las roturas de doble cadena en el DNA o DSBs constituyen unas de las lesiones más graves que pueden darse en el material genético. Las vías más importantes para repararlas son la recombinación homóloga (HR: *homologous recombination*), -que opera mayoritariamente durante las fases S y G2 del ciclo celular- y la unión de extremos no homólogos (NHEJ: *non-homologous end joining*), que actúa en la fase G1 del ciclo (Heyer y col., 2010). En *S. cerevisiae*, la ruta de HR constituye la principal vía de reparación de las DSBs, mientras que el mecanismo de NHEJ -frecuentemente mutagénico- juega tan solo un papel minoritario (Friedl y col., 1998).

1.4.5.1. Reparación por unión de extremos no homólogos (NHEJ)

En *S. cerevisiae*, la ruta de NHEJ se inicia por el reconocimiento de los extremos de la DSB por el complejo Ku70/Ku80, que se une a ellos protegiéndolos de la degradación y marcándolos como sitios de daño. Esto promueve el reclutamiento del complejo MRX (Mre11-Rad50-Xrs2), que hace posible el contacto entre los extremos de la rotura. Posteriormente se une al sitio de la rotura un tercer complejo, homólogo de DNA ligasa IV/XRCC4 en humanos, formado por una ligasa específica de NHEJ, Dnl4,

y un factor asociado, Lif1, que promueve el procesamiento y relleno del sitio de corte mediante el reclutamiento de la endonucleasa Rad27 y de la polimerasa Pol4. Una vez generados los extremos religables, Dnl4 sella el corte y la reparación se completa (Daley y col., 2005; Hefferin y Tomkinson, 2005).

1.4.5.2. Reparación por recombinación homóloga (HR)

La recombinación homóloga (HR) juega un papel muy importante en la reparación de las lesiones presentes en el DNA (fundamentalmente las DSBs) y además es responsable de un gran número de procesos biológicos importantes, como algunos aspectos de la tolerancia al daño en el DNA, el mantenimiento de la longitud de los telómeros en células que carecen de telomerasa y del número de copias del DNA ribosomal, y la correcta segregación cromosómica durante la primera división meiótica. Asimismo, se propone que la recombinación homóloga tiene un papel en el restablecimiento de las horquillas de replicación rotas o que han sido bloqueadas (Lisby y col., 2001; Li y Heyer, 2008). No obstante, la recombinación es también potencialmente peligrosa, ya que puede originar reordenamientos cromosómicos e intermediarios letales (Kolodner y col., 2002) y por ello está muy regulada. La reparación de roturas de doble cadena por HR se lleva a cabo mediante la copia de secuencias de DNA homólogas intactas, del cromosoma homólogo no dañado o de la cromátida hermana –preferentemente-, que sirven como molde para restaurar la información genética perdida en el sitio o región de la rotura (Paques y Haber, 1999; Symington, 2002). Ello da lugar a la transferencia de información genética hacia la molécula que ha tenido la rotura –conversión génica- o a un intercambio recíproco entre las dos moléculas –entrecruzamiento-.

En el modelo actual sobre el proceso de reparación de DSB, la ruta de recombinación homóloga se inicia con el reconocimiento del sitio de corte por el complejo MRX, formado por las proteínas Mre11/Rad50/Xrs2 en *S. cerevisiae* (MRE11/RAD50/NBS1 en células humanas) (Heyer y col., 2010). La actividad endonucleasa de Mre11 y la nucleasa Sae2 fosforilada llevan a cabo el proceso inicial de resección, en el que se produce la degradación exonucleolítica de los extremos 5' que han quedado libres tras producirse la DSB, lo que origina pequeñas regiones de ssDNA con extremos 3'-OH libres. La actividad CDK durante la fase S facilita esta resección, al mismo tiempo que previene el mecanismo de NHEJ (Ira y col., 2004). A continuación se realiza la extensión del tramo reseccionado mediante la nucleasa Exo1 o, alternativamente, por la acción conjunta de la helicasa Sgs1 y de la nucleasa Dna2. Posteriormente tiene lugar el revestimiento de los extremos 3'-OH libres por la proteína RPA y la interacción de esta última con Rad52, esencial en todos los procesos de recombinación en *S. cerevisiae* (Mortensen y col., 1996). Rad52 interacciona a su vez con Rad51 y facilita su deposición sobre el DNA de cadena sencilla, reemplazando a RPA. Tras ello, el extremo 3' revestido de Rad51 invade el fragmento de DNA homólogo donador de información y se genera una región de DNA heterodúplex y una estructura de bucle de desplazamiento, o *D-loop* (*displacement-loop*), produciéndose de esta forma un intercambio de cadenas entre las moléculas implicadas. Todo ello permite cebar la síntesis de DNA sobre la secuencia homóloga invadida, que actúa como molde. Además de las proteínas citadas, otras como Rad54 y Rad55 contribuyen a todo este

proceso, si bien su papel concreto no está del todo bien definido. Una vez formado el *D-loop*, las células pueden proceder de distintas maneras para finalizar el proceso de reparación (Krogh y Symington, 2004; Sung y Klein, 2006; Pardo y col., 2009), según sean uno o dos los extremos de la rotura de doble cadena que encuentran homología. Estas diferentes posibilidades se explican a continuación.

a) Reparación de un corte de doble cadena con dos extremos homólogos

Se pueden dar tres casos [Fig. I5]:

a1. Reparación de rotura de doble hebra o DSBR (*double strand break repair*). Es el mecanismo o modelo clásico de reparación de roturas de doble cadena (Szostak y col., 1983). La hebra que queda desplazada al formarse el bucle o *D-loop* se utiliza por el extremo 3'-OH libre como molde para la síntesis de DNA, y ambos extremos del corte se ven implicados en la reparación con la molécula donadora de información. Una vez producida la ligación, se generan dos estructuras cruciformes de DNA duplexo -estructuras de Holliday (HJs, *Holliday junctions*)- que necesitan ser procesadas para que se puedan restablecer las dos cadenas del DNA intactas. El procesamiento de las HJs puede ser por rotura simétrica de las mismas, en cuyo caso podrá dar lugar a entrecruzamiento o a conversión génica, según la orientación de corte de las dos HJs, o por disolución, caso en el que se produciría la migración de ambas de forma convergente hasta su resolución, sin que exista sobrecruzamiento [Fig. I5C].

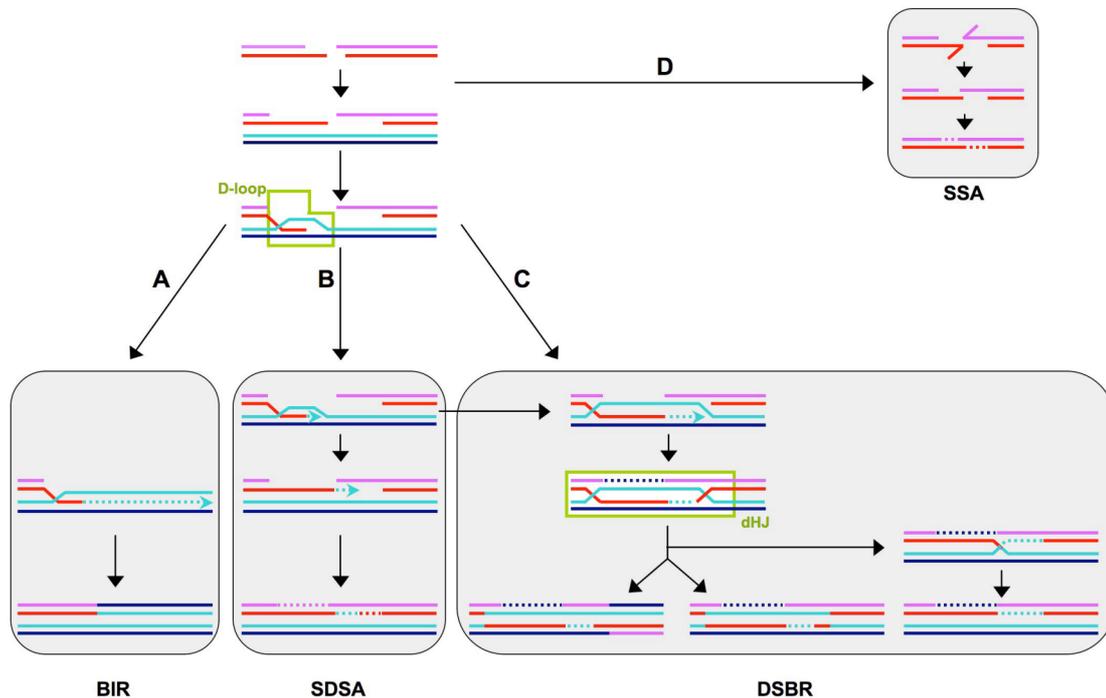


Figura I5. Modelos de reparación de DSB mediante HR [Modificado de Heyer y col., 2010]. A) En el modelo BIR, la síntesis de DNA de la cadena que invade se produce hasta el final de la molécula. B) El modelo SDSA solo origina productos sin entrecruzamientos. C) En el modelo DSBR, la invasión de los dos extremos de la DSB da lugar a la formación de una dHJ, que será resuelta posteriormente implicando la generación de productos con o sin entrecruzamientos. D) La DSB localizada entre dos repeticiones directas es procesada mediante SSA de manera que se produce la pérdida de una de las repeticiones y de la secuencia localizada entre ambas.

En el caso de resolución de las HJs por procesamiento nucleolítico intervienen resolvasas específicas. Recientemente se ha identificado una proteína de la familia de

nucleasas Rad2/XPG con actividad resolvasa *in vitro* e *in vivo* (Yen1 en *S. cerevisiae*, y su homóloga GEN1 en células humanas), capaz de realizar cortes simétricos en las HJs según el modelo establecido para la resolvasa clásica de *E. coli* RuvC (Ip y col., 2008; West, 2009). Al igual que RuvC, Yen1/GEN1 se une a las HJs y las resuelve por un mecanismo de incisión doble que produce una rotura simétrica. Esto es posible gracias a la capacidad de Yen1/GEN1 para ensamblarse en las HJs en forma de dímero, lo que permite la coordinación de dos sitios activos alineados simétricamente (Rass y col., 2010). Asimismo, otra nucleasa, Mus81-Eme1/Mms4, también puede resolver HJs, si bien no cumple las condiciones de resolvasa “clásica”. Mus81-Eme1/Mms4 corta HJs con mella (nHJs) y produce normalmente un corte asimétrico (Ciccía y col., 2003; Gaillard y col., 2003; Ehmsen y Heyer, 2008). Esta incisión también puede ser simétrica en algunas condiciones, ante elevadas concentraciones de la proteína, y puede depender de la formación de un heterotetrámero de la misma (Gaskell y col., 2007; Taylor y McGowan, 2008). Las principales características y funciones de este complejo se explicarán en detalle en el apartado 1.5.

La resolución de las HJs mediante disolución en *S. cerevisiae* se lleva a cabo por el complejo formado por la helicasa Sgs1, la topoisomerasa Top3 y el factor específico Rmi1 (Ira y col., 2003; Chang y col., 2005; Mullen y col., 2005), los ortólogos de BLM, TopoIII α y RMI1/RMI2 en células humanas, que suprimen en estas los entrecruzamientos que se producen durante la recombinación homóloga (Wu y Hickson, 2003).

a2. *Reasociación de cadenas dependiente de síntesis o SDSA (synthesis-dependent strand annealing)*. La síntesis de DNA tiene lugar a partir de un extremo 3'-OH invasor, utilizando el DNA homólogo intacto como molde. La cadena sintetizada se desplaza de este mediante la acción de helicasas y se empareja con las secuencias complementarias en el otro extremo del corte. En el caso de sobrepasarse la zona de homología, el extremo 3' sobrante se procesa nucleolíticamente. El hueco generado se rellena mediante nueva síntesis de DNA y se sella posteriormente. Este mecanismo no produce entrecruzamientos ni alteraciones de la cadena duplexa donante, y constituye la vía mayoritaria de reparación de las DSBs (Paques y Haber, 1999; Symington, 2002) [Fig. I5B].

a3. *Reasociación de cadenas sencillas o SSA (single strand annealing)*. Tiene lugar cuando la DSBs se localiza entre repeticiones directas de secuencias de DNA. Si las cadenas sencillas generadas tras el procesamiento de los extremos de la DSB son lo suficientemente extensas, Rad52 media el emparejamiento entre las secuencias homólogas, y las colas de ssDNA sobrantes son procesadas por la 3' flap endonucleasa Rad1-Rad10. Se produce por tanto una delección entre las dos regiones homólogas, por lo que esta ruta es considerada mutagénica (Heyer y col., 2010; Kass y Jasin, 2010) [Fig. I5D]. El proceso de SSA no requiere intercambio de cadenas, y no necesita la intervención de Rad51, pero sí requiere, además de Rad52, la actuación de Rad59 (homólogo del anterior) y de RPA.

b) Reparación de un corte de doble cadena con un extremo

Cuando solo un extremo del corte encuentra homología con otra región, la reparación de la DSB puede producirse por el mecanismo de replicación inducida por rotura o BIR (*break-induced replication*). En este caso, el extremo 3'-OH único invade la cadena homóloga y, tras la formación del *D-loop*, sirve de cebador para la síntesis de DNA hasta el final del cromosoma (Malkova y col., 1996; Paques y Haber, 1999; Symington, 2002). Este proceso conlleva la conversión génica de grandes regiones de DNA, puede resultar en una pérdida de heterocigosis a gran escala y dar lugar incluso a la duplicación de un brazo cromosómico (Signon y col., 2001) [Fig. 15A].

1.4.6. Mecanismos de tolerancia al daño en el DNA

Las rutas de tolerancia al daño en el DNA (DDT, *DNA damage tolerance*) contribuyen a hacer frente a los bloqueos en la progresión de las horquillas de replicación originados por lesiones en el material genético. Estas rutas están mediadas por las proteínas Rad6/Rad18 y hacen posible la replicación a través de lesiones no reparadas que bloquean las DNA polimerasas replicativas impidiendo la síntesis de DNA (Friedberg y col., 2005).

Existen dos ramas principales de tolerancia al daño en el DNA, que difieren en su potencialidad para causar mutagénesis: la vía de síntesis a través de lesiones (TLS, *translesion synthesis*) y la ruta de cambio de molde (*template switching*) [Fig. 16].

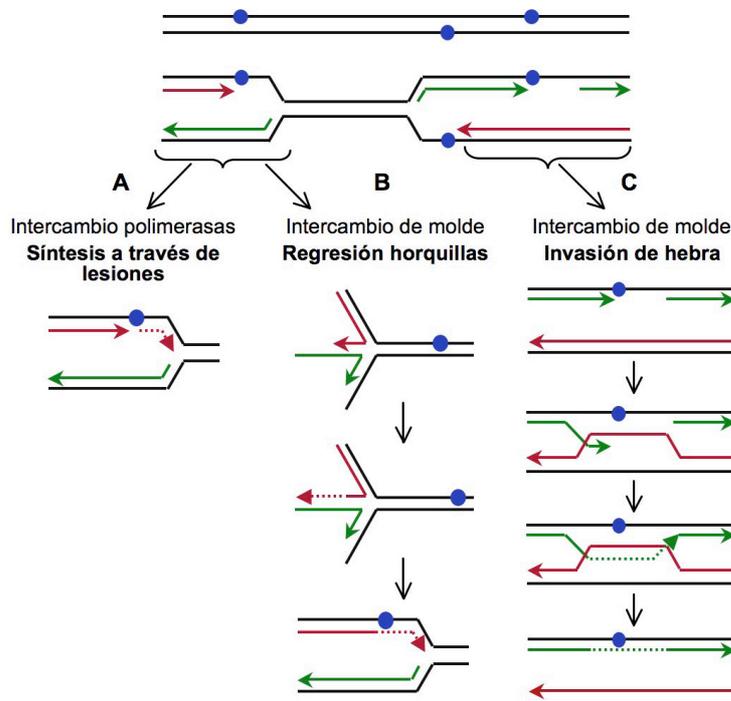


Figura 16. Mecanismos de tolerancia al daño dependientes de Rad6-Rad18 [Modificado de Unk y col., 2010]. Si las horquillas de replicación se detienen por la presencia de una lesión sin reparar en el DNA (representada con un círculo de color azul), la síntesis a través de lesiones (A) puede conducir al *bypass* del daño implicando un intercambio de polimerasas que puede ser mutagénico. Sin embargo, los dos modelos propuestos para el mecanismo de intercambio de molde mediado por Rad5 (B, regresión de horquillas y C, invasión de hebra), conducen a un modo de reparación de la lesión libre de error.

Durante la síntesis a través de lesiones, diferentes polimerasas de baja fidelidad (polimerasas TLS o de *bypass*) replican directamente a través de la lesión, normalmente introduciendo errores, y el proceso es frecuentemente mutagénico [Fig. 16A]. No obstante, el resultado de TLS puede ser una síntesis de DNA sin errores, dependiendo del tipo de daño y de la polimerasa empleada, como por ejemplo en la inserción por

Pol η de dos adeninas frente a un dímero de timina originado por luz UV. En la segunda rama de DDT, el proceso de cambio de molde, se evita la lesión al utilizar como molde para la replicación la cadena no dañada recién sintetizada de la cromátida hermana [Fig. I6B-C]. Este proceso está libre de errores y no es por tanto mutagénico.

En ausencia de daño en el DNA, el complejo Ubc9/Siz1 modifica PCNA de *S. cerevisiae* por SUMOilación en la Lys164 y en la Lys127. Esta modificación permite el reclutamiento de la helicasa Srs2, que inhibe la recombinación homóloga durante una replicación normal (Pfander y col., 2005). En presencia de estrés genotóxico, la E3-ubiquitina ligasa Rad18 se une al DNA de cadena sencilla, recluta a Rad6 (enzima E2-conjugadora) y el complejo ubiquitilador PCNA en el mismo residuo Lys164 (Hoegge y col., 2002). La PCNA monoubiquitilada facilita la síntesis a través del DNA dañado mediante el reclutamiento de las polimerasas de síntesis a través de lesiones (TLS) y el reemplazo de las polimerasas replicativas. Posteriormente, el heterodímero E2 conjugador de ubiquitina Mms2-Ubc13, en conjunción con la E3-ligasa Rad5, lleva a cabo la poliubiquitilación de PCNA en el mismo residuo Lys164, mediante cadenas de ubiquitinas unidas por la Lys63 (Hoegge y col., 2002; Chiu y col., 2006), lo cual es necesario para el proceso de cambio de molde. Ni la monoubiquitilación ni la poliubiquitilación de PCNA promueven su degradación.

En *S. cerevisiae*, las polimerasas implicadas en la síntesis a través de lesiones son Pol η , codificada por *RAD30*, y Pol ζ , perteneciente a la familia B de polimerasas y formada por las subunidades Rev3 (catalítica) y Rev7, que coopera con Rev1. Rev1 es una deoxicitidil transferasa que inserta dCMP enfrente de la lesión y, junto con Pol η , pertenece a la familia Y de polimerasas de DNA. Todas ellas tienen homólogas en células humanas (Friedberg, 2005). Rad5, implicada en el cambio de molde en DDT, es un miembro de la familia SWI/SNF de ATPasas, y posee actividad helicasa (Blastyak y col., 2007), necesaria para esta vía. Se han propuesto dos modelos para explicar este mecanismo libre de error: regresión de las horquillas de replicación e invasión de hebra, según el esquema de la Fig. I6. En células humanas existen dos ortólogos de *RAD5*, HLTF y SHPRH, ambos implicados en el mantenimiento de la estabilidad del genoma (Motegi y col., 2006).

1.5. La nucleasa Mus81-Mms4/Eme1 y su papel en la respuesta al daño en el DNA

Una proteína asociada a la reparación de lesiones en el material genético por recombinación es la nucleasa Mus81-Mms4/Eme1, ampliamente conservada entre los eucariotas e importante para prevenir la inestabilidad genómica cuando el DNA está dañado (Osman y Whitby, 2007; Ciccia y col., 2008). Además de un papel en la respuesta al daño en el DNA en células somáticas, esta nucleasa tiene también una función durante la recombinación meiótica, si bien considerablemente menor en *S. cerevisiae* que en *S. pombe*, donde fue descrita (Boddy y col., 2001; Novak y col., 2001; de los Santos y col., 2003; Hollingsworth y Brill, 2004).

Mus81 (MMS y UV Sensible) fue identificada en ensayos de dos híbridos por su interacción con la proteína Rad54 en *S. cerevisiae* (Interthal y Heyer, 2000) y con la quinasa del *checkpoint* Cds1 en *S. pombe* (Boddy y col., 2000). Mus81 pertenece a la

familia XPF/MUS81 de endonucleasas específicas de estructura (SSEs, *structure-specific endonucleases*). Como otros miembros de esta familia, Mus81 forma un complejo heterodimérico junto a una subunidad no catalítica, Mms4 en *S. cerevisiae* y *Drosophila* (Eme1 en *S. pombe* y plantas, EME1/EME2 en células humanas). Asimismo, Mus81 contiene un dominio nucleasa ERCC4 (*excision repair cross complementation group 4*) en la mitad C-terminal, característico de la familia XPF, y dos motivos HhH (*helix-hairpin-helix*) situados en ambos extremos de la proteína, a diferencia del resto de miembros de la familia, donde forman un tándem en el extremo C-terminal. Estos motivos participan probablemente en la dimerización y unión de la nucleasa al DNA y son necesarios para su actividad catalítica (Newman y col., 2005; Nishino y col., 2005). Las subunidades no catalíticas, Mms4 o Eme1, tienen un dominio HhH en su extremo C-terminal y un dominio nucleasa defectivo e inactivo. La región C-terminal es importante para la interacción con Mus81 y podría también contribuir a la unión del complejo al DNA (Mullen y col., 2001; Ciccia y col., 2003; Fu y Xiao, 2003).

La endonucleasa Mus81-Mms4/Eme1 puede procesar *in vitro* una amplia variedad de sustratos de estructura ramificada que se asemejan a horquillas de replicación rotas, como ramificaciones con extremos 3' (*3'-flaps*), *D-loops* o HJs con mellas o roturas (Boddy y col., 2001; Kaliraman y col., 2001; Mullen y col., 2001; Osman y col., 2003) [Fig. I7]. A diferencia de lo propuesto inicialmente (Boddy y col., 2001), y como ya se ha mencionado en el apartado 1.4, Mus81 no se comporta como una resolvasa clásica, y no corta con eficiencia HJs intactas (Fricke y col., 2005; Ehmsen y Heyer, 2008). No obstante, esta actividad podría darse en un contexto celular como parte de un complejo con otras nucleasas como SLX1/SLX4 y XPF/ERCC1, como se ha mostrado recientemente en células humanas (Fekairi y col., 2009; Svendsen y col., 2009).

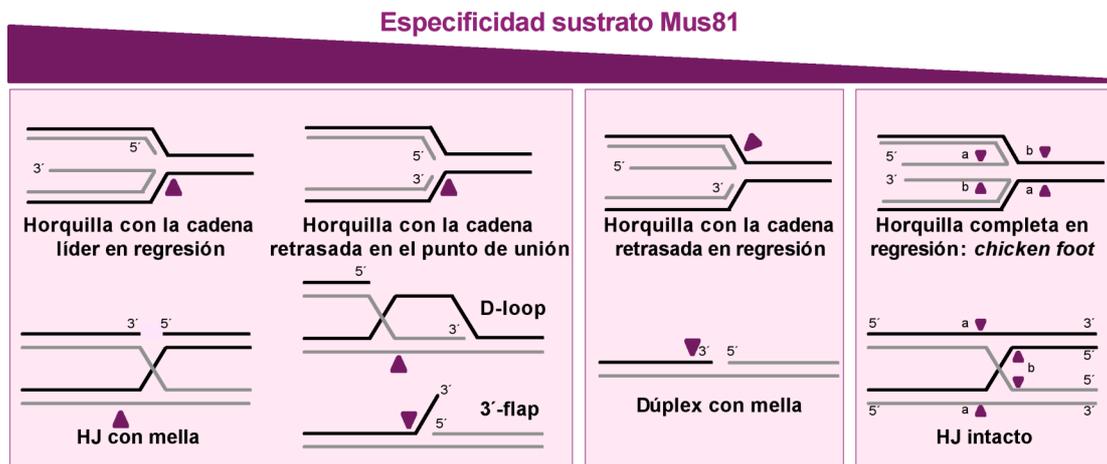


Figura I7. Esquema de la especificidad de sustrato de la endonucleasa Mus81-Mms4 [Basado en Osman y Whitby, 2007]. Las diversos tipos de estructuras se representan de izquierda a derecha en orden decreciente con respecto a la preferencia específica de los complejos Mus81-Mms4/Eme1 por las mismas. El sitio de corte de la endonucleasa se representa con un triángulo de color morado.

Aunque Mus81 no es esencial, su delección es letal para las células en ausencia del complejo de disolución de las dHJs Sgs1-Top3-Rmi1, lo que indica que sus funciones pueden ser complementarias. En *S. cerevisiae* y en *Drosophila sp*, la letalidad sintética que muestran Mus81 y Mms4 con los miembros de dicho complejo se suprime

al eliminar los primeros pasos de la recombinación (por ejemplo, con la delección de Rad51), lo que sugiere que las moléculas procesadas por Mus81 y Sgs1-Top3-Rmi1 podrían ser intermediarios tardíos del proceso de HR (Mullen y col., 2001; Fabre y col., 2002; Bastin-Shanower y col., 2003; Ii y Brill, 2005; Trowbridge y col., 2007). De hecho, en *S. pombe*, al menos algunas funciones de Mus81 dependen de Rad22, homóloga a Rad52 (Fabre y col., 2002; Bastin-Shanower y col., 2003; Doe y col., 2004).

Los mutantes de levaduras *mus81Δ*, *mms4Δ* y *eme1Δ* son sensibles a agentes causantes de daño en el material genético o estrés replicativo que interfieren con la replicación del DNA, como el MMS, la luz UV y la camptotecina (CPT) y, en menor medida, a la hidroximetilurea (HU) (Boddy y col., 2000; Interthal y Heyer, 2000; Doe y col., 2002; Bastin-Shanower y col., 2003), lo que indica que Mus81-Mms4/Eme1 puede ser de gran importancia en la reparación de horquillas de replicación bloqueadas o rotas en células somáticas. Sin embargo, los mutantes de esta nucleasa no muestran defectos en la reparación de DSBs generadas después del tratamiento con radiación ionizante (IR) (Interthal y Heyer, 2000).

Teniendo en cuenta todo lo anterior, se ha propuesto que Mus81/Mms4 podría estar implicada en el procesamiento de intermediarios de recombinación que resultasen de la reparación de horquillas dañadas y/o en la rotura de horquillas de replicación paradas o bloqueadas para permitir la recombinación homóloga (Kaliraman y col., 2001; Doe y col., 2002; Osman y Whitby, 2007). Sin embargo, todavía se desconoce cuál es claramente su papel *in vivo* y cuáles son sus sustratos fisiológicos.

En *S. cerevisiae*, la delección de *YEN1*, el gen que codifica la resolvasa de uniones de Holliday (ver Apdo. 1.4.5.2), aumenta la sensibilidad de las células *mus81Δ* al daño causado en el material genético por agentes como el MMS, la luz UV o la CPT (Blanco y col., 2010; Tay y Wu, 2010), de lo que se deduce que ambas nucleasas tienen funciones complementarias importantes para la respuesta celular al daño en el DNA. A diferencia de los mutantes *mus81Δ*, los mutantes *yen1Δ* son muy poco o nada sensibles al tratamiento con los agentes anteriormente citados (Blanco y col., 2010), lo que sugiere que Mus81-Mms4 es la principal vía de reparación de las lesiones originadas por los mismos, mientras que Yen1 podría ser necesaria en algunas circunstancias, como la ausencia de Mus81 o tras la formación de estructuras que quizás Mus81 no pueda procesar con eficacia. De acuerdo con esta idea, en *S. cerevisiae* Mus81 es la principal nucleasa implicada en la resolución de intermediarios de recombinación en células mitóticas, lo que puede dar lugar a la formación de sobrecruzamientos, ejerciendo Yen1 una función en su ausencia (Ho y col., 2010). Asimismo, en estudios recientes realizados con células procedentes de pacientes con síndrome de Bloom (que carecen del procesamiento mediante disolución de las HJs), se ha mostrado que el silenciamiento de MUS81 y GEN1 provoca un importante número de anomalías cromosómicas (Wechsler y col., 2011). Sin embargo, el silenciamiento único de MUS81 en las mismas células no genera un efecto similar, lo que sugiere que GEN1 puede compensar su función. Confirmando la relación funcional y el solapamiento en la actuación de ambas proteínas, en *S. pombe* (organismo que carece de ortólogos de

GEN1/YEN1), la expresión de la proteína GEN1 humana alivia los defectos en meiosis de las células *mus81Δ* (Lorenz y col., 2010).

Por último, cabe destacar que la ausencia de Mus81 en *S. cerevisiae* produce un notable incremento en la frecuencia de pérdidas y aneuploidías cromosómicas, fenotipo incrementado por la delección de *YEN1* (Ho y col., 2010). Esta inestabilidad genómica se observó también en células de ratón en las que alguna de las copias del gen *MUS81* se había eliminado (McPherson y col., 2004; Dendouga y col., 2005). En el primero de estos estudios se propuso que la carencia de Mus81 aumenta la predisposición a desarrollar tumores en ratones, si bien el segundo trabajo, aun mostrando la importancia de *MUS81* para prevenir la inestabilidad genómica, discrepa de su papel en la prevención de la formación de células cancerosas. De acuerdo con el primero, ensayos recientes con líneas celulares humanas indican que la expresión de *MUS81* está disminuida a más de la mitad en pacientes de cáncer colorrectal, y se correlaciona significativamente con casos de metástasis hepática (Wu y col., 2010). Por tanto, es posible que el seguimiento de los niveles de Mus81 pueda ser empleado en algunos casos como marcador tumoral.

OBJETIVOS

El objetivo general del trabajo realizado en esta tesis doctoral es contribuir al conocimiento de los procesos que las células eucarióticas utilizan para hacer frente al daño en el DNA durante la replicación cromosómica, haciendo posible la estabilidad del genoma.

Los objetivos específicos son:

- Analizar la contribución de las rutas de reparación por escisión de bases, recombinación homóloga y tolerancia al daño en el DNA de *S. cerevisiae* al mantenimiento de la estabilidad genómica durante la replicación cromosómica en presencia de lesiones en el material genético.
- Caracterizar el papel de la nucleasa Mus81-Mms4 de *S. cerevisiae* en la respuesta celular al daño en el DNA durante la fase S del ciclo celular.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. CEPAS

1.1. Cepas de *Saccharomyces cerevisiae*

Todas las cepas empleadas en esta tesis derivan de W303 (Thomas y Rothstein, 1989). Sus correspondientes genotipos se describen en la Tabla MM1.

Nombre	Genotipo	Fuente
W303-1a	MATa <i>ade2-1 ura3-1 his3-11,15 trp1-1 leu2-3,112 can1-100</i>	(Thomas y Rothstein, 1989)
W303-1b	MATa <i>ade2-1 ura3-1 his3-11,15 trp1-1 leu2-3,112 can1-100</i>	(Thomas y Rothstein, 1989)
YJT75	MATa <i>sml1Δ::URA3 rad53Δ::LEU2</i>	Esta tesis
YJT110	MATa <i>ade2-1::ADE2 ARS608Δ::HIS3 ARS609Δ::TRP1</i>	Esta tesis
YJT117	MATa <i>ade2-1::ADE2 rad18Δ::kanMX ARS608Δ::HIS3 ARS609Δ::TRP1</i>	Esta tesis
YJT126	MATa <i>sml1Δ::URA3 TUB1-GFP::TRP1</i>	Esta tesis
YJT127	MATa <i>sml1Δ::URA3 rad53Δ::LEU2 TUB1-GFP::TRP1</i>	Esta tesis
YJT129	MATa <i>DDC2-GFP::TRP1</i>	Esta tesis
YJT144	MATa <i>ade2-1::ADE2 rad52Δ::kanMX ARS608Δ::HIS3 ARS609Δ::TRP1</i>	Esta tesis
YJT146	MATa <i>ade2-1::ADE2 mag1Δ::kanMX ARS608Δ::HIS3 ARS609Δ::TRP1</i>	Esta tesis
YJT157	MATa <i>ade2-1::ADE2 rad18Δ::kanMX rad52Δ::URA3 ARS608Δ::HIS3 ARS609Δ::TRP1</i>	Esta tesis
YJT158	MATa <i>ade2-1::ADE2 rad18Δ::kanMX rad52Δ::URA3 TUB1-GFP::LEU2 ARS608Δ::HIS3 ARS609Δ::TRP1</i>	Esta tesis
YVR5	MATa <i>ade2-1::ADE2 rad18Δ::kanMX TUB1-GFP::LEU2 ARS608Δ::HIS3 ARS609Δ::TRP1</i>	Esta tesis
YVR6	MATa <i>ade2-1::ADE2 rad52Δ::kanMX TUB1-GFP::LEU2 ARS608Δ::HIS3 ARS609Δ::TRP1</i>	Esta tesis
YVR7	MATa <i>ade2-1::ADE2 mag1Δ::kanMX TUB1-GFP::LEU2 ARS608Δ::HIS3 ARS609Δ::TRP1</i>	Esta tesis
YVR9	MATa <i>RAD52-GFP::TRP1</i>	Esta tesis
YVR10	MATa <i>MAG1-GFP::KanMX</i>	Esta tesis
YVR16	MATa <i>ade2-1::ADE2 ARS608Δ::HIS3 ARS609Δ::TRP1 mag1::GAL-3HA-MAG1::KanMX</i>	Esta tesis
YVR17	MATa <i>ade2-1::ADE2 ARS608Δ::HIS3 ARS609Δ::TRP1 rad52::GAL-3HA-RAD52::KanMX</i>	Esta tesis
YVR18	MATa <i>ade2-1::ADE2 ARS608Δ::HIS3 ARS609Δ::TRP1 rad18::GAL-3HA-RAD18::KanMX</i>	Esta tesis
YMV1	MATa <i>sml1Δ::URA3, rad53Δ::LEU2</i>	Esta tesis
YMV2	MATa <i>sml1Δ::URA3, rad53Δ::LEU2, MAG1-GFP::kanMX</i>	Esta tesis
YMV6	MATa <i>sml1Δ::URA3, rad53Δ::LEU2, RAD52-GFP::TRP1</i>	Esta tesis
YMV17	MATa <i>ade2-1::ADE2 mus81Δ::kanMX, ARS608Δ::HIS3, ARS609Δ::TRP1</i>	Esta tesis

YMV18	MATa <i>ade2-1::ADE2 mus81Δ::kanMX sml1Δ::URA3 rad53Δ::LEU2 ARS608Δ::HIS3 ARS609Δ::TRP1</i>	Esta tesis
YMV19	MATa <i>ade2-1::ADE2 mus81Δ::kanMX sml1Δ::URA3 ARS608Δ::HIS3 ARS609Δ::TRP1</i>	Esta tesis
YMV20	MATa <i>MUS81-3HA::His3MX6</i>	Esta tesis
YMV22	MATa <i>ade2-1::ADE2 mus81Δ::KanMX ARS608Δ::HIS3 ARS609Δ::TRP1 TUB1-GFP::LEU2</i>	Esta tesis
YMV23	MATa <i>ade2-1::ADE2 ARS608Δ::HIS3 ARS609Δ::TRP1 mus81::GAL-3HA-MUS81::KanMX</i>	Esta tesis
YMV31	MATa <i>ade2-1::ADE2 ARS608Δ::HIS3 ARS609Δ::TRP1 mms4Δ::URA3</i>	Esta tesis
YMV32	MATa <i>ade2-1::ADE2 ARS608Δ::HIS3 ARS609Δ::TRP1 mms4Δ::URA3 mus81Δ::KanMX</i>	Esta tesis
YMV33	MATa <i>mms4::ADH-3HA-MMS4::natNT2</i>	Esta tesis
YMV39	MATa <i>mus81Δ::KanMX</i>	Esta tesis
YMV42	MATa <i>mms4::ADH-3HA-MMS4::natNT2 mus81Δ::KanMX</i>	Esta tesis
YMV48	MATa <i>mms4Δ::URA3</i>	Esta tesis
YMV49	MATa <i>mus81Δ::KanMX mms4Δ::URA3</i>	Esta tesis
YSG23	MATa <i>mus81::GAL-3HA-MUS81::KanMX mms4::GAL-3HA-MMS4::HisMX</i>	Esta tesis
YSG24	MATa <i>mus81::ADH-3HA-MUS81::natNT2 mms4::ADH-3HA MMS4::natNT2</i>	Esta tesis
YJT161	MATa <i>yen1Δ::LEU2</i>	Esta tesis
YJT162	MATa <i>yen1Δ::LEU2 mus81Δ::KanMX</i>	Esta tesis

Tabla MM1. Descripción de las cepas empleadas en esta tesis.

1.2. Cepas de *E. coli*

-DH5 α : *supE44*, Δ *lacU169* (ϕ 80*lacZ* Δ M15), *hsdR17*, *recA1*, *endA1*, *gyrA96*, *thi-1*, *relA1* (Hanahan, 1983).

2. PLÁSMIDOS

Los plásmidos utilizados en esta tesis se describen en la Tabla MM2.

Nombre	Características	Referencia
pRS305	p-Bluescript- <i>LEU2</i>	(Sikorski y Hieter, 1989)
pRS306	p-Bluescript- <i>URA3</i>	(Sikorski y Hieter, 1989)
pRS306-EGFP	p-Bluescript- <i>URA3-EGFP</i>	(Labib y col. , 1999)
pVR4	800 pb de la mitad 3' de <i>RAD52</i> , clonados en pRS306-EGFP	Esta tesis
pML4	pFA6a-GFP(s65T)- <i>kanMX6</i>	(Longtine y col., 1998)
pML9	pFA6a-3HA- <i>His3MX6</i>	(Longtine y col., 1998)
pML19	pFA6a- <i>kanMX6</i> -PGAL1-3HA	(Longtine y col., 1998)
pUG6	Casete de interrupción génica:loxP- <i>kanMX</i> -loxP	(Güldener y col., 1996)
pKL153	pRS305-TUB1GFP	(Labib y col., 2001)
pYM-N8	ADH-3HA- <i>natNT2</i>	(Janke y col., 2004)

Tabla MM2. Plásmidos empleados en este trabajo.

3. OLIGONUCLEÓTIDOS

Los oligonucleótidos utilizados en esta tesis fueron suministrados por Invitrogen y se detallan en la Tabla MM3.

Nombre	Secuencia
Oligo 5'-del.rad52	5'ATGCAAACAAGGAGGTTGCCAAGAACTGCTGAAGGTTCTGGTGGCTTTGGTGTGTTGTTGCATCAGAGCAGATTGTA CTGAGAGTGC 3'
Oligo 3'-del.rad52	5'AGGATTTTGGAGTAATAAATAATGATGCAAATTTTTTATTGTTTCGGCCA GGAAGCGTTCGCATCTGTGCGGTATTTACACCCG 3'
Oligo 5'-del.rad18/Kan	5'AAGAAAAACCATCCGCAAGTGAGCATCACAGCTACTAAGAAAAGGCCATTT TACTACTCCAGCTGAAGCTTCGTACGC 3'
Oligo 3'-del.rad18/Kan	5'ATTATTAATTAACAAATGTGCACAAGCTAACAACAGGCCTGATTACATAT ACACACCCATAGGCCACTAGTGGATCTG 3'
Oligo 5'-del.mag1/Kan	5'TACTTTTCCTTTTTAATTTTTTACTGAGAATCAAGAGAAGCTAGAGAGGGA TTGGTCTCACAGCTGAAGCTTCGTACGC 3'
Oligo 3'-del.mag1/Kan	5'ATTTATTTTTATTTTTTTTTTTTCTTATATAAATGTCAGTAATACATGATAT CTTTAAGCATAGGCCACTAGTGGATCTG 3'
Oligo 5'-del.mus81/kan(B)	5'CTTTAAGAGTGGCATCAACATTGGCGTAAACAAAGTTTCAAAGGATTGATA CGAACACACATTCCTAGCATGAAAGCATGCAGCTGAAGCT TTCGTACGC 3'
Oligo 3'-del.mus81/kan(B)	5'TATAAACCTTGCAGGATGACTATATTTCAAATTGCTAAAGTTTACCAA AGCATCATATATCTTTTCTGAAAGAGATTCATAGGCCACTAGTGGATCTG 3'
Oligo 5'-del.mms4	5'AAAGAACAAATGTATGGATTATGGTATAGAATAATAGTAGTCACA TATTGCAGCTAGTTAACATCAGAGCAGATTGTA CTGAGAGTGC 3'
Oligo 3'-del.mms4	5'TGCAGTGATTTTCAAACGACTGCCTTAAGGTATGTTCTTATATA CAAAGTTTCGTTGACGCATCTGTGCGGTATTTACACCCG 3'
Oligo 5'-del.yen1	5'ATGAAATGACAGTTCTATTGCATTTTACCTACTTGTATATTCTGG ATACTGCACAAGAAACATCAGAGCAGATTGTA CTGAGAGTGC 3'
Oligo 3'-del.yen1	5'TCCCTCGTTTTTCGGCGCATCAACTGTGGTGGCGGATTTTTTGAC GCTGTGCCGTTAACCGCATCTGTGCGGTATTTACACCCG 3'
Oligo 5'-Gal-HA-MAG1	5'TAAGTTATCTATGAATCAATGAGAATTGGCCACTGCCCTCTGATA TGACGATGGAAGTGGGAATTCGAGCTCGTTTAAAC 3'
Oligo 3'-Gal-HA-MAG1	5'TGCTATTTCCTTAACAGCGTCTGCTTTTATTA ACTCATCACTCC CTTTTTAGTTTCATGCACTGAGCAGCGTAATCTG 3'
Oligo 5'-Gal-HA-RAD52B	5'ATTATATTCTTTAGTCTGTTAAGAAAAGACGAAAAATATAGCGGCGGGCGG GTTACGCGAGAATTCGAGCTCGTTTAAAC 3'
Oligo 3'-Gal-HA-RAD52B	5'GTCTCGGAATGTTACCGAAAACGGGCTTCTTCTCATCCATATCCATAATT TCATTCATGCACTGAGCAGCGTAATCTG 3'
Oligo 5'-Gal-HA-RAD18	5'TTTCAATAGAAAGTGAAAACTAAGTACC ACTTGAGCAATGCCACATTAGA AGAAAAACCGAATTCGAGCTCGTTTAAAC 3'
Oligo 3'-Gal-HA-RAD18	5'GTACAGGCTCGGTATTGAAGTAGTCGTGAAGTCGCTTGCAGTGGTTATTTG GTGGTCCATGCACTGAGCAGCGTAATCTG 3'
Oligo 5'-Gal-HA-MUS81	5'ATTGCGCTCATCAACTTCTTTTCTTACCGATCGCGGTAATGCCCTTTAAGAG TGGCATCAGAATTCGAGCTCGTTTAAAC 3'
Oligo 3'-Gal-HA-MUS81	5'GTCAACTAATTTGTAAACCATCAATATATAGGTCTTTAAGTTTGATGA GAGTTCCATGCACTGAGCAGCGTAATCTG 3'
Oligo 5'-mag1-tag	5'AGGCTCGCGAGCAAAATACAGATGCCATGATGAAGCAGAAGAAAATTC GTGAAATCCCGGATCCCGGGTTAATTA 3'
Oligo 3'-mag1-tag	5'TTTATTTTTATTTTTTTTTTCTTATATAAATGTCAGTAATACATGATATC TTTAAGTTAGAATTCGAGCTCGTTTAAAC 3'
Oligo 5' RAD52-GFP tag	5'TCGACACGAAGAGAAGTTGGAAGACCAAAGATCAATCCCCTGCATGCACGC AAGCCTACTCGGATCCCGGGTTAATTA 3'
Oligo 3' RAD52-EGFP	5'ACACACCCATGGCACCCGCTCCAGCGCCTGCACCAGCTCCAGTAGGCTTGCG TGCATGCAGGGGA 3'
Oligo 5'-mus81-tag	5'GGTGCAAGAAAATTAATAATCTCTTTCAGAAAAGATATATGATGCTTTT GGTAAACTTCGATCCCGGGTTAATTA 3'
Oligo 3'-mus81-tag	5'GAATATCATCACTTTTTTCTTTATAAACCTTGCAGGGATGACTATATTTT CAAATTGCTAGAATTCGAGCTCGTTTAAAC 3'
Oligo 5'-NtermTAG-mms4	5'CGTAAATAAAGAACAATGTATGGATTATGGTATAGAATAATAGTAGTCACA TATTGCAGCTAGTTAAATGCGTACGCTGCAGGTCGAC 3'
Oligo 3'-NtermTAG-mms4	5'GTCCATCGATGATCTGAATACTGGCATCGTTTCTTGAATCTTTGCTCAAC AAAATCAACGATCTGGCTCATCGATGAATTCCTGTCTG 3'

Oligo 5'-test del mag1	5' TGTGATACTGATTCTCTCGT 3'
Oligo 3'-test del mag1	5' GCCAAGAGCTCCGATGAG 3'
Oligo 5'-test del rad52	5' CAACGCCAGCAGTAAAAT 3'
Oligo 3'-test del rad52	5' CCGAGTTGCCATATTTGT 3'
Oligo 5'-test del rad18	5' CCCGCTCTTCTATGGTAT 3'
Oligo 3'-test del rad18	5' ACTTAACGTGGAGATCAC 3'
Oligo 5'-test del mus81	5' CGTAATGTATTGGGCACCTT 3'
Oligo 3'-test del mus81	5' GTCAAAGGTTTGCTACTGGA 3'
Oligo 5'-test del mms4	5' GTTGATGAGACACCTTTGCT 3'
Oligo 3'-test del mms4	5' AGGACAGACTTAATGAAGAC 3'
Oligo MMS4-RE	5' GAGAGACGAATCTATGATGG 3'
Oligo 5'-test del rad53	5' CGTGGGTAGACTTGAAATG 3'
Oligo 3'-test del rad53	5' CTTGTTGTACCACATCAAGC 3'
Oligo 5'-test del yen1	5' GGCATTGAACACTGGCTGTT 3'
Oligo 3'-test del yen1	5' TTACAATCCACTATACGGTC 3'
Kan FW	5' CCTCGACATCATCTGCCC 3'
Kan RE	5' GGATGTATGGGCTAAATG 3'
His FW	5' GAATGATCATCACCGTAGTG 3'
His RE	5' CGTTTATCTTGCCTGCTCAT 3'
Leu FW	5' CATCGAATTTGATTCTGTGC 3'
Leu RE	5' GTAAAGGAATACAGGTAAGC 3'
Trp FW	5' CAGTGCAGCTTACAGAAAAC 3'
Trp RE	5' CCGCAAACCTTACCAATGG 3'
Ura FW	5' GACATGGGTGGAAGAGATGA 3'
Ura RE	5' GAACATCCAATGAAGCACAC 3'
5'-ARS607	5' GGTCACCAACAAGACGGAGG 3'
3'-ARS607	5' TGTGATACTGATTCTCTCGT 3'
Oligo VI-2.1	5' CTATCACTCGATGGTGCAAC 3'
Oligo VI-2.2	5' GTGGAGAGTGAAGATGACGA 3'
Oligo VI-3.1	5' CCTGAATGGTCTCAATTTGT 3'
Oligo VI-3.3	5' GACTAGTCGAATATGGGTTT 3'
Oligo VI-5.7	5' GCAAGTAAGCAGCCATCGTC 3'
Oligo VI-5.8	5' GCAAGTTCTCGGTTCCCTTG 3'
Oligo VI-6.5	5' GATCCATTATTTGCAGCGGT 3'
Oligo VI-6.6	5' GCGTTACCGATTAATGACAC 3'
Oligo ARS609-1	5' TTTTTTGGATCCCCTTCCCATAAGAATTCCAAACGG 3'
Oligo ARS609-2	5' TTTTTTCTCGAGGGGTATCTTCTGTGAGTAAACTAACG 3'
oligo 305 deln-5'test-Nº55	5' TAAGTTACCATTATCGAAGGC 3'
oligo 305 deln-3'test-Nº56	5' AGTATTATGGTAGCACCATG 3'
oligo probe A-5'	5' CTTATAGGAAACCTATCGTT 3'
oligo probe A-3'	5' GAGCAGTACTTGCCCTCCGA 3'
oligo probe B-5'	5' GAATCTTCTGAAGCCAATTC 3'
oligo probe B-3'	5' CACACATTTCTGTTACTTAG 3'
Oligo 5'Gal- HA- MMS4	5'CAACGCGTTGAAGTACCCTTTTTCAGAAAAAATGGTTGTATACGTAAATA AAGAACAATGAATTCGAGCTCGTTTAAAC 3'
Oligo 3'Gal- HA- MMS4	5'CTGAATACTGGCATCGTTTCTTGAATCTTTGCTCCTCAACAAAATCAACGATC TGGCTCATGCACTGAGCAGCGTAATCTG 3'

Oligo 5'-NtermTAG-mus81	5'GGCATCAACATTGGCGTAAACAAAGTTTCAAAGGATTGATACGAA CACACATTCCTAGCATGAAAGCATGCGTACGCTGCAGGTCGAC 3'
Oligo 3'-NtermTAG-mus81	5'TAGGGGTAAATCCGTCAACTAATTCTTGTAACCATTCAATATATAG GTCTTTTAAGTTTGATGAGAGTTCCATCGATGAATTCTCTGTCG 3'

Tabla MM3. Oligonucleótidos empleados en esta tesis.

4. MEDIOS Y CONDICIONES DE CULTIVO

4.1. Cultivos de *S. cerevisiae*

Los cultivos se crecieron rutinariamente a 30 °C, salvo que se indique lo contrario en algún experimento, tanto en medio líquido como en medio sólido. El crecimiento en medio líquido se siguió por observación al microscopio óptico y recuento del número de células en cámaras de Neubauer.

Para el crecimiento de *S. cerevisiae* se utilizó de forma habitual el medio rico YPD. Cuando fue necesario, se emplearon medios de selección o de esporulación. Todos ellos se describen a continuación:

⇒ **YP:** extracto de levadura 1% (Difco), bacto-peptona 2% (Difco), al que se añade el azúcar necesario, según el tipo de experimento, al 2%. Los azúcares empleados fueron: D-glucosa (Merck), utilizado de forma rutinaria (medio “YPD”), D-rafinosa (Sigma-Aldrich) o D-galactosa (Sigma-Aldrich). Para la preparación de medio sólido se añade agar 2% (Difco).

⇒ **Medio mínimo selectivo:** Base nitrogenada de levadura (YNB) sin aminoácidos 0,67% (Difco), glucosa 2%, junto con los correspondientes requerimientos auxotróficos, según los marcadores de selección de cada cepa, a la siguiente concentración final: adenina 0,04 mg/ml, uracilo 0,04 mg/ml, L-leucina 0,08 mg/ml, L-triptófano 0,04 mg/ml y L-histidina 0,04 mg/ml (todos de Sigma-Aldrich). Para la preparación de placas de medio mínimo selectivo se añade agar 2%. En los experimentos de microscopía de fluorescencia el medio se enriquece suplementándolo con adenina 0,14%.

⇒ **Medio para experimentos de sustitución de isótopos de densidad:** YNB sin aminoácidos y sin sulfato amónico 0,16% (Difco); ácido succínico 1,1% (Sigma-Aldrich), NaOH 0,67% (Merck), suplementado con isótopos pesados: D-glucosa ($^{13}\text{C}_6$) 0,1% y sulfato amónico ($^{15}\text{N}_2$) 0,01% (Cambridge Isotope Laboratories), o ligeros: D-glucosa 2% (^{12}C) y sulfato amónico 0,01% (^{14}N) (Merck; isótopos empleados habitualmente en el laboratorio). Deben añadirse también los requerimientos auxotróficos específicos de cada cepa.

⇒ **Medio rico de esporulación (RSM):** Extracto de levadura 0,25%, acetato potásico CH_3COOK 0,15 M, D-glucosa 0,1%, agar 2% y H_2O . Una vez autoclavada esta mezcla, se le añade una solución con los requerimientos autotróficos, a una concentración final del 2,5% (solución stock: adenina 0,4%, uracilo 0,4%, L-histidina 0,2%, L-leucina 0,2%, L-lisina 0,2%, L-triptófano 0,2%, L-tirosina 0,08%, L-fenilalanina 1%, L-metionina 0,2% y L-arginina 0,2%; todos de Sigma-Aldrich. Se esteriliza por filtración.

Para la selección por resistencia a antibióticos se utilizaron geneticina (Gibco) o nourseotricina (Werner BioAgents), a una concentración final de 200 µg/ml y 100 µg/ml, respectivamente.

4. 2. Cultivos de *E. coli*

La bacteria *E. coli* se cultivó de forma habitual a 37 °C, tanto en medio líquido como sólido. Se empleó rutinariamente el medio LB: bacto-triptona 1% (Difco), extracto de levadura 0,5% (Difco), NaCl 1% (Merck). En el caso de medios sólidos se añade agar 2%. Para la selección por resistencia a ampicilina, tanto en medio líquido como sólido, se añadió dicho antibiótico (Sigma-Aldrich) a una concentración final de 100 µg/ml.

5. REACTIVOS Y ENZIMAS

Las sales inorgánicas, ácidos, bases y compuestos orgánicos fueron proporcionados por Merck, Sigma-Aldrich, Fluka, PRS-Panreac, Gibco, Calbiochem y USB. Las soluciones de acrilamida 40% y bis-acrilamida 2%, así como los marcadores de peso molecular de proteínas, fueron suministrados por BioRad.

El metil metano sulfonato (MMS), la hidroxurea (HU) y el nocodazol fueron adquiridos en Sigma-Aldrich. El factor α fue proporcionado por el servicio de síntesis de péptidos del CBMSO.

Los *kits* empleados para la obtención de DNA plasmídico (“Minipreps DNA purification system”) y para la purificación de productos de PCR o bandas de gel de agarosa (“Gel and PCR Clean-Up System”) fueron adquiridos en Promega, mientras que el *kit* empleado para la obtención de DNA genómico de levaduras (“Blood & Cell Culture DNA Midi Kit”) fue proporcionado por Qiagen.

Las enzimas de restricción fueron suministradas por Roche, New England Biolabs (NEB) o Fermentas. Para la amplificación de fragmentos de DNA por PCR se utilizaron las DNA polimerasas Vent (NEB), Ex Taq (Takara) y Go Taq (Promega). La RNasa A, la pepsina, la β -glucuronidasa y la liticasa fueron adquiridas en Sigma-Aldrich. La proteinasa K y la enzima Klenow fueron proporcionadas por Roche. La zimoliasa-20T fue suministrada por Seikagaku.

6. CONSTRUCCIÓN DE CEPAS DE *S. cerevisiae*

Los mutantes de delección se obtuvieron mediante sustitución génica. Para ello, se transformó la cepa correspondiente con un producto de PCR resultante de la amplificación del plásmido portador del marcador de selección (pRS305, pRS306 o pUG6) con oligonucleótidos específicos que portaban extremos de secuencia idéntica a las regiones flanqueantes del fragmento a reemplazar (la fase de lectura abierta –ORF-completa del gen en cada caso).

Las cepas que incorporan la fusión *TUB1-GFP* se obtuvieron mediante transformación directa con el plásmido pKL153, que fue previamente linearizado. La

cepa YVR9 fue obtenida por transformación con el plásmido pVR4, previamente linearizado.

Las cepas en las que el gen de interés se situó bajo el control del promotor *GALI-10* se obtuvieron mediante transformación con un producto de PCR obtenido empleando el plásmido pML19 como molde. Las cepas en las que proteínas a estudio se etiquetaron con *GFP* (a excepción de YVR9) o con el epítipo HA se construyeron por transformación con un producto de PCR obtenido utilizando como moldes los plásmidos pML4 (para la fusión con GFP) o pYM-N8 y pML9 (para la fusión con el epítipo HA, en el extremo amino-terminal o en el carboxi-terminal, respectivamente). La amplificación de estos fragmentos se realizó con oligonucleótidos que portaban en sus extremos secuencias idénticas a las de las zonas flanqueantes del sitio del cromosoma donde se iba a insertar, inmediatamente antes o después de la ORF, según el caso.

En algunas ocasiones, las cepas se obtuvieron por cruces genéticos entre cepas isogénicas haploides portadoras de las deleciones o caracteres de interés. Para ello, se mezclaron las cepas correspondientes (MAT α y MAT α) en una placa de YPD y se incubaron toda la noche a 24 °C. Se aislaron colonias y los diploides se seleccionaron por marcadores -cuando fue posible- o mediante elección de las colonias con las células de mayor tamaño mediante observación al microscopio. Posteriormente, se esporularon en medio RSM a 24 °C durante 2-3 días y se separaron las esporas resuspendiéndolas en H₂O e incubándolas toda la noche con β -glucuronidasa a temperatura ambiente, utilizando una noria. Tras observar al microscopio la correcta digestión de las ascas, las esporas se centrifugaron, se resuspendieron en H₂O y se plaquearon en medio YPD para su posterior selección.

La correcta construcción de las cepas fue analizada por PCR del DNA genómico, empleando combinaciones de oligonucleótidos que hibridaban en zonas internas del fragmento insertado y en regiones del genoma flanqueantes al mismo. Además, en el caso de las cepas en las que la proteína de interés estaba etiquetada, se comprobó la correcta expresión de la proteína de fusión mediante inmunoblot. Cuando fue posible, las cepas construidas fueron identificadas por su fenotipo (morfología celular, sensibilidad a distintos compuestos, etc). En todos los casos se comprobó también que las cepas obtenidas mostraban un crecimiento normal con respecto al tipo silvestre a distintas temperaturas (16 °C, 24 °C, 30 °C y 37 °C).

7. MÉTODOS DE TRANSFORMACIÓN CELULAR

7.1. Transformación de *E. coli*

La transformación de células competentes de *E. coli* con DNA plasmídico se llevó a cabo según el método descrito por Hanahan (1983), explicado brevemente a continuación. Siguiendo este protocolo, las células competentes (habitualmente una alícuota de 100 μ l, proporcionada por el Servicio de Fermentación del CBMSO) guardadas a -70 °C, se descongelan en hielo y se mantienen en el mismo durante 20 min. Seguidamente, se añade el DNA, se mezcla con las células y se dejan en hielo durante 15 min. Tras ello, las células se someten a un choque térmico durante 90 s a 42

°C, se enfrían en hielo, se resuspenden en 4 volúmenes de medio LB y se incuban 45 min a 37 °C para permitir la expresión del gen de resistencia al antibiótico. A continuación se centrifugan 1 min a 15000 rpm, se resuspenden en un volumen pequeño de medio LB y se plaquean para su selección. Los transformantes se seleccionan en placas de medio LB con ampicilina, creciendo las células durante toda la noche a 37 °C.

7.2. Transformación de *S. cerevisiae*

Las células de levaduras se transformaron con DNA exógeno según el método descrito por Schiestl y Gietz (1989) y modificado posteriormente por Gietz y col. (1992). Se parte de 4.10^8 células en fase exponencial (entre 6.10^6 y 1.10^7 céls/ml), crecidas en medio YPD. Se centrifugan a 3000 rpm durante 3 min a temperatura ambiente, se lavan con H₂O y con acetato de litio (AcLi)/TE 100 mM, pH 7,5 (TE: Tris 10 mM pH 8.0, EDTA 1 mM), y posteriormente se resuspenden en 200 µl de AcLi/TE 100 mM pH 7.5. Para cada transformación se mezclan 50 µl de esta suspensión celular, 5 µl de DNA de esperma de salmón (10 mg/ml, Sigma-Aldrich), 1-2 µg de DNA y 300 µl de AcLi/PEG (se prepara fresco a partir de 1 vol. de AcLi 1M pH 7.5, 1 vol. de TE 10X y 8 vol. de polietilenglicol 4000, PEG, 50%), y se incuban en agitación a 30 °C durante 30 min. A continuación se añaden 40 µl de dimetil sulfóxido (DMSO, Sigma-Aldrich) y las células se someten a un choque térmico durante 15 min a 42 °C y posteriormente a una incubación de 2 min en hielo. Tras ello, se centrifugan 5 s a 15000 rpm. En el caso de usar geneticina o nourseotricina como marcadores de selección, las células se resuspenden en 1 ml de YPD y se mantienen en agitación a 30 °C durante 2,5 ó 3 h, respectivamente (expresión fenotípica). A continuación, se centrifugan 1 min a 15000 rpm, se resuspenden en 100 µl de TE y se siembran en placas de YPD en presencia del antibiótico. En el caso de usar marcadores auxotróficos para la selección, las células se plaquean directamente en medio sólido selectivo tras el choque térmico y el posterior enfriamiento en hielo. En ambos casos, las placas se incuban a 30 °C durante 2 ó 3 días.

8. ANÁLISIS DE LA PROGRESIÓN EN EL CICLO CELULAR MEDIANTE CITOMETRÍA DE FLUJO

Se siguió básicamente el protocolo descrito por Labib y col. (1999). Se toman muestras de 1 ml de cultivo, se centrifugan, y las células se resuspenden en etanol 70% y se guardan a 4 °C. Para el análisis por citometría de flujo, se transfieren 50-200 µl de las células en etanol a un tubo con 3 ml de citrato sódico 50 mM para su rehidratación, y se centrifugan 3 min a 3000 rpm. A continuación se resuspenden en 0,5 ml de citrato sódico 50 mM con RNasa A 0,1 mg/ml, y se incuban a 37 °C durante 2-4 h. Posteriormente, se centrifugan 3 min a 3000 rpm, se resuspenden en una solución de HCl 50 mM con 5 mg/ml de pepsina y se incuban durante 30 min a 37 °C. Tras ello, las muestras se centrifugan de nuevo 3 min a 3000 rpm y se resuspenden en 1 ml de citrato sódico 50 mM con 2 µg/ml de yoduro de propidio (Sigma-Aldrich) para la tinción del DNA.

Las muestras se procesaron empleando un citómetro FACScalibur de BD Biosciences y el software CellQuestPro, que permitió analizar el contenido de DNA de las células.

9. SINCRONIZACIÓN EN EL CICLO CELULAR

Las células fueron sincronizadas en la fase G1 del ciclo celular mediante la adición de factor α al cultivo a una concentración final de 5-10 $\mu\text{g/ml}$. La sincronización en fase S temprana se llevó a cabo tratando a las células con hidroxIUrea (200 mM). Para bloquear las células en G2/M se utilizó nocodazol, a una concentración de 5 $\mu\text{g/ml}$.

En todos los casos, la sincronización en cada una de las fases del ciclo celular fue seguida por observación de las células al microscopio óptico y, cuando fue necesario, se comprobó también mediante citometría de flujo.

10. EXTRACCIÓN, AMPLIFICACIÓN Y DIGESTIÓN DE DNA

10.1. Extracción de DNA plasmídico de *E. coli*

La purificación a pequeña escala del DNA plasmídico de *E. coli* se realizó utilizando el *kit* “Minipreps DNA purification system” (Promega), siguiendo las instrucciones del fabricante.

10.2. Extracción de DNA genómico de *S. cerevisiae*

10.2.1. Extracción habitual de DNA genómico

El método usado para la extracción del DNA genómico se basó en el descrito por Rose y col. (1989). Se parte de 10 ml de cultivo y las células se centrifugan durante 3 min a 3000 rpm. A continuación se resuspenden en 0,2 ml de solución de lisis (NaCl 100 mM, Tris 10 mM pH 8,0, EDTA 1 mM, SDS 0,1%), y se transfieren a un tubo eppendorf con aproximadamente 0,3 ml de perlas de vidrio de 0,4 mm (Thomas Scientific). Se añaden 0,2 ml de fenol:cloroformo (1:1) y se agitan en el vórtex durante 1 min. A continuación se añaden 0,2 ml de TE y se agitan unos segundos en el vórtex. Se centrifugan a 14000 rpm durante 5 min y se recoge la fase superior, a la que se añade un volumen de cloroformo. Se mezcla y se vuelve a centrifugar 1 min. La fase superior se transfiere a un tubo nuevo y se añaden dos volúmenes de etanol 100% para precipitar el DNA. Se mezcla por inversión y se centrifuga 3 min a 14000 rpm. Tras ello, se descarta el sobrenadante y el precipitado obtenido se lava con etanol 70%, se seca, se resuspende en TE con RNasa A 100 $\mu\text{g/ml}$ y se incuba a 37 °C durante al menos 30 min. La cantidad y calidad del DNA obtenido se examina en un gel de agarosa (Pronadisa) al 1%.

10.2.2. Extracción de DNA genómico para análisis en geles bidimensionales

El protocolo empleado para la obtención de las muestras de DNA se basó en el descrito por Friedman y Brewer (1995) y se realizó según se detalla en Calzada y col. (2005). Se parte de 200 ml de cultivo con células en fase exponencial de crecimiento, al que se añade azida sódica (Merck) a una concentración final de 0,1%. Las células se mantienen en hielo durante 10-30 min y, tras ello, se centrifugan a 5000 rpm y 4 °C durante 4 min. Se retira el sobrenadante, se lavan con 50 ml de H₂O a 4 °C y se centrifugan a 3000 rpm y 4 °C durante 5 min. A continuación, se resuspenden en

tampón NIB (glicerol 17%, MOPS 50 mM, acetato potásico 150 mM, MgCl₂ 2 mM, espermidina 500 μM (Sigma-Aldrich) y espermina 150 μM (Sigma-Aldrich) y se lisan con perlas de vidrio de 0,4 mm mediante 10 ciclos en los que se alternan 30 s al vórtex y 30 s de incubación en agua-hielo. Una vez comprobado al microscopio que la lisis celular es mayor del 90%, se recoge el extracto celular y se lavan las perlas de vidrio dos veces con 5 ml de tampón NIB, recogiendo de nuevo el extracto, que se une al anterior. Posteriormente, el extracto obtenido se centrifuga 10 min a 3000 rpm, a 4 °C. Tras eliminar el sobrenadante, se añaden 5 ml de tampón G2 (kit de Qiagen) y se deja 5 min a temperatura ambiente para facilitar la resuspensión del precipitado. La muestra se incuba durante 30 min a 37 °C con 0,2 mg/ml de RNasa A. Tras ello, se añaden 0,4 mg/ml de Proteinasa K, y se incuba durante 1 h a 37 °C. A continuación, la muestra se centrifuga durante 5 min a 3000 rpm, a 4 °C, se transfiere el sobrenadante a un nuevo tubo, se añaden 5 ml de tampón QBT (kit de Qiagen) y se carga en las columnas del kit, previamente equilibradas con 4 ml de tampón QBT. Las columnas se lavan dos veces con 7,5 ml de tampón QC (kit de Qiagen) y posteriormente el DNA se eluye con 5 ml de tampón QF (kit de Qiagen), precalentado a 50 °C. La muestra se reparte en tubos eppendorf (830 μl/tubo) y se añaden 580 μl de isopropanol a cada uno de ellos. Se mezcla por inversión y los tubos se centrifugan 25 min a 15000 rpm, a 4 °C. El precipitado obtenido se lava con 100 μl de etanol 70% y posteriormente se centrifuga 5 min a temperatura ambiente. Se elimina el sobrenadante y se deja secar el precipitado a temperatura ambiente hasta que adquiere un aspecto transparente. Finalmente se resuspende en 20 μl de TE y se mantiene durante toda la noche a temperatura ambiente.

10.2.3. Extracción de DNA genómico para experimentos de electroforesis en geles de campo pulsado

El método empleado se realizó básicamente según lo descrito por Lengronne y col. (2001), y se detalla a continuación. Se parte de 1×10^8 células, a las que se añade azida sódica (concentración final 0,1%), tras lo que se mantienen en hielo durante 10-15 min. A continuación, se centrifugan y se lavan con 1 ml de la solución: azida sódica 0,1%, Tris-HCl 10 mM, EDTA 50 mM, pH 8.0. Las muestras se centrifugan y se resuspenden en 250 μl de tampón de zimoliasa 2X (tampón fosfato 50 mM pH 7.0, EDTA 100 mM, DTT 20 mM, zimoliasa 20T 0,2 mg/ml), precalentado a 50 °C. Tras ello, se añade 1 volumen de agarosa de bajo punto de fusión (Incert Agarose, de FMC Bioproducts) al 1%, mantenida a 50 °C, y la mezcla se reparte en moldes para obtener el DNA embebido en dados de agarosa. Una vez solidificados, los dados se transfieren a tubos eppendorf, se les añade 0,4 ml de tampón de zimoliasa y se incuban a 37 °C durante toda la noche. Posteriormente, se realizan dos lavados de 1 h con 1 ml de TE, agitando los tubos en una noria. Tras ello, los dados se incuban a 50 °C durante 48 h en 0,4 ml de la solución: Tris-HCl 10 mM pH 7.5, EDTA 200 mM, N-lauril-sarcosina 1% y proteinasa K 2 mg/ml. Seguidamente, se transfieren a tubos de 5 ml y se realizan 5 lavados a temperatura ambiente, con agitación suave, de 1 h, con 3 ml de una solución Tris-HCl 10 mM pH 7.5, EDTA 50 mM. Los dados se guardan a 4 °C en esta solución hasta la realización de la electroforesis.

10.3. Amplificación de DNA mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Para amplificar fragmentos de DNA por PCR se emplearon diferentes DNA polimerasas (Apdo. 5) y los tampones correspondientes, según las indicaciones del fabricante. Las reacciones se llevaron a cabo en volúmenes variables (20-100 μ l), utilizando oligonucleótidos suministrados por Invitrogen y dNTPs adquiridos en Biotools o Roche. Como molde se emplearon cantidades variables de DNA plasmídico o genómico, o una pequeña cantidad de biomasa celular de *S. cerevisiae* tomada directamente de una placa. En este último caso, la muestras se calentaron 1 min en un microondas a potencia máxima previamente a la reacción de amplificación, que se llevó a cabo con la enzima GoTaq. La duración de los ciclos de extensión y la temperatura de apareamiento fueron variables, dependiendo del tamaño del fragmento a amplificar y de la T_m de los oligonucleótidos.

Cuando los fragmentos amplificados se utilizaron para transformar *S. cerevisiae* fueron purificados previamente con un *kit* de Promega (Apdo. 5) siguiendo las instrucciones del fabricante, directamente después de la PCR o a partir de una banda de agarosa obtenida tras separar el fragmento mediante electroforesis.

10.4. Digestión enzimática de DNA

Las digestiones del DNA se llevaron a cabo con diversas endonucleasas de restricción, siguiendo las instrucciones del fabricante. De forma habitual se realizaron en un volumen de 20-100 μ l, durante 1-6 h.

11. ELECTROFORESIS Y TRANSFERENCIA A MEMBRANAS DE DNA

11.1. Electroforesis habitual de DNA en geles de agarosa

El análisis de las moléculas de DNA se llevó a cabo de forma rutinaria mediante electroforesis en geles de agarosa. Esto permitió separar fragmentos de distintos tamaños y estimar la calidad y cantidad del DNA a estudio. Dependiendo del tamaño de los mismos, se emplearon geles de agarosa de 0,7-2,5%, preparados en TAE (Tris-acetato 40 mM, EDTA 1 mM) con bromuro de etidio (0,5 μ g/ml). El DNA fue visualizado mediante exposición a luz UV.

11.2. Electroforesis bidimensional en geles de agarosa

Esta técnica permite conocer cómo se replica un fragmento de restricción de DNA específico *in vivo*, y se basa en el hecho de que la movilidad electroforética en gel de una molécula de DNA depende tanto de su tamaño como de su forma. La muestra se digiere y se somete a una primera electroforesis (primera dimensión) en la que la baja concentración de agarosa y el bajo voltaje aplicados hacen que la contribución de la forma del DNA en su migración sea mínima, y que por tanto las moléculas se separen según su tamaño. Durante la electroforesis en la segunda dimensión, tanto el voltaje como la concentración de agarosa se aumentan, y además se incluye un agente intercalante, el bromuro de etidio. Estas condiciones hacen que el efecto de la forma afecte notablemente a la migración electroforética del DNA, permitiendo de este modo

diferenciar moléculas de DNA con distintos tamaños y formas. El DNA del gel resultante se transfiere e hibrida con una sonda específica que reconoce el fragmento a analizar, y las estructuras habituales que se pueden encontrar se representan en el esquema de la Figura MM1.

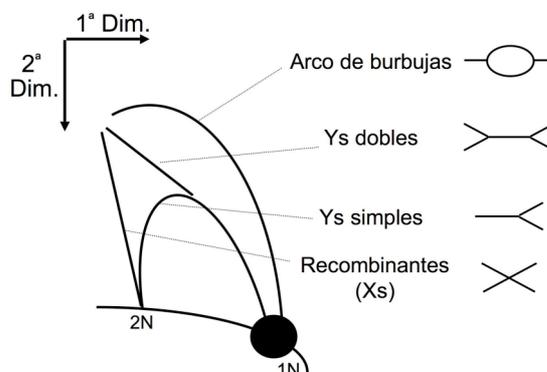


Figura MM1. Esquema del patrón básico obtenido en los gels bidimensionales de DNA.

Cuando el DNA es replicado de forma pasiva por una horquilla que lo recorre desde un extremo del fragmento, se genera un patrón con forma de Y conocido como arco de Ys simples (Fig. MM1). Este arco parte del punto 1N, que se corresponde con moléculas de DNA lineales no replicadas, y termina en el punto 2N (moléculas replicadas). Cuando el fragmento de restricción es replicado por dos horquillas convergentes, se forma el arco de Ys dobles. El arco de burbujas se genera cuando el fragmento de restricción analizado contiene un origen de replicación activo. Finalmente, la estructura en forma de X está constituida por intermediarios de recombinación con un contenido de DNA 2N.

En los experimentos realizados en esta tesis, la electroforesis correspondiente a la primera dimensión se llevó a cabo en gels de agarosa al 0,4% en TBE (Tris base 89 mM, ácido bórico 89 mM, EDTA 2 mM), que se corrieron a 21 V (0,6 V/cm) durante 40 h, a temperatura ambiente. Tras ello, las tiras correspondientes a cada muestra se cortaron y rotaron 90°, y se situaron en la parte superior de los gels de la segunda dimensión. Ambas partes se sellaron con agarosa al 1%. La segunda dimensión se realizó en gels de agarosa al 1% en TBE, en presencia de 0,5 µg/ml de bromuro de etidio. Los gels se corrieron a 160 V (4,4 V/cm) durante 7 h a 4 °C.

11.3. Electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE)

La electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE) fue desarrollada por Schwartz y Cantor (1984) y permite separar fragmentos de DNA de gran tamaño. Esta separación se consigue induciendo su reorientación mediante cambios periódicos en el campo eléctrico. En una electroforesis convencional, el campo eléctrico constante empleado ocasiona que los fragmentos de DNA de 30-50 kb migren con la misma movilidad y se detecten en el gel como una única banda difusa. En una PFGE, los fragmentos se someten a dos campos eléctricos de distinta orientación. Durante la aplicación del primero de ellos, los fragmentos se estiran y orientan según la dirección del mismo. Al aplicar un segundo campo eléctrico en sentido perpendicular, el DNA se reorienta y migra en la dirección del mismo. El tiempo empleado en esta reorientación depende del

tamaño de los fragmentos, de modo que los más pequeños migrarán antes en la dirección del segundo campo eléctrico, separándose así de los fragmentos de mayor tamaño. Mediante la aplicación de sucesivos cambios en el campo eléctrico, los diferentes fragmentos que se detectan como una banda difusa en una electroforesis estándar se separan de este modo en bandas discretas.

Para llevar a cabo estos experimentos, los dados de agarosa con el DNA, preparados según lo descrito en el apartado 10.2.3, se cargaron en geles de agarosa al 1% (Agarose NA, de GE Healthcare)-TBE de 150 ml. El aparato empleado para las electroforesis fue un “Gene Navigator System” de Pharmacia Biotech. Los geles se corrieron a 180 V (6 V/cm) durante 24 h a 14 °C, aplicando pulsos de 90 s, 105 s y 125 s durante 9,6, 6 y 8,4 h, respectivamente. Tras ello, se tiñeron durante 30 min en una solución de 0,5 µg/ml de bromuro de etidio en TBE y se analizaron en un sistema de documentación de geles de BioRad. La captura de imágenes también se llevó a cabo tras el desteñido del gel durante 30-60 min en una solución de TBE 0,5%. El análisis se realizó empleando el programa informático Quantity One, y la cuantificación se llevó a cabo sobre las bandas correspondientes a las parejas de cromosomas VII-XV y XVI-XIII, durante la fase G1 y a las 2 y 4 h tras la liberación del MMS.

11.4. Transferencia de DNA a membranas

Tras las electroforesis, los geles de agarosa se incubaron en agitación suave durante 20 min a temperatura ambiente en NaOH 0,4 N. A continuación, el DNA se transfirió por capilaridad a membranas de nailon cargadas positivamente (Hybond-XL, GE-Healthcare) durante aproximadamente 16 h, utilizando como solución de transferencia NaOH 0,4 N. Cuando se necesitó transferir con eficiencia fragmentos grandes de DNA, los geles se trataron con HCl 0,25 M a temperatura ambiente durante 15 min previamente a la incubación con NaOH 0,4 N. Después de la transferencia, las membranas se incubaron brevemente en tampón sodio-fosfato 40 mM (a partir de un stock 0,5 M: Na₂HPO₄ 400 mM, NaH₂PO₄ 100 mM), en agitación suave, y se dejaron secar a temperatura ambiente.

En los experimentos de sustitución de isótopos de densidad, las fracciones obtenidas de los gradientes fueron desnaturalizadas con NaOH 0,4 N y transferidas a membranas de nailon Hybond XL (GE-Healthcare) mediante vacío, utilizando un *slot blotter*.

12. ENSAYO DE SUSTITUCIÓN DE ISÓTOPOS DE DENSIDAD

Esta técnica consiste en la transferencia de células desde un medio con isótopos pesados a un medio con isótopos ligeros (isótopos habituales), o viceversa, para obtener secuencias de DNA híbridas en densidad -gracias a que la replicación del material genético es semiconservativa- que pueden ser identificadas como moléculas replicadas. Utilizando sondas de DNA específicas a lo largo de un cromosoma, este método permite determinar el porcentaje de replicación en cualquier posición de un replicón y la velocidad de las horquillas de replicación. El protocolo empleado, basado en el descrito por McCarroll y Fangman (1988) y adaptado en Tercero y col. (2000), se realizó según

se detalla en Tercero (2009). En la Figura MM2 se muestra una visión esquemática de este método, explicado a continuación.

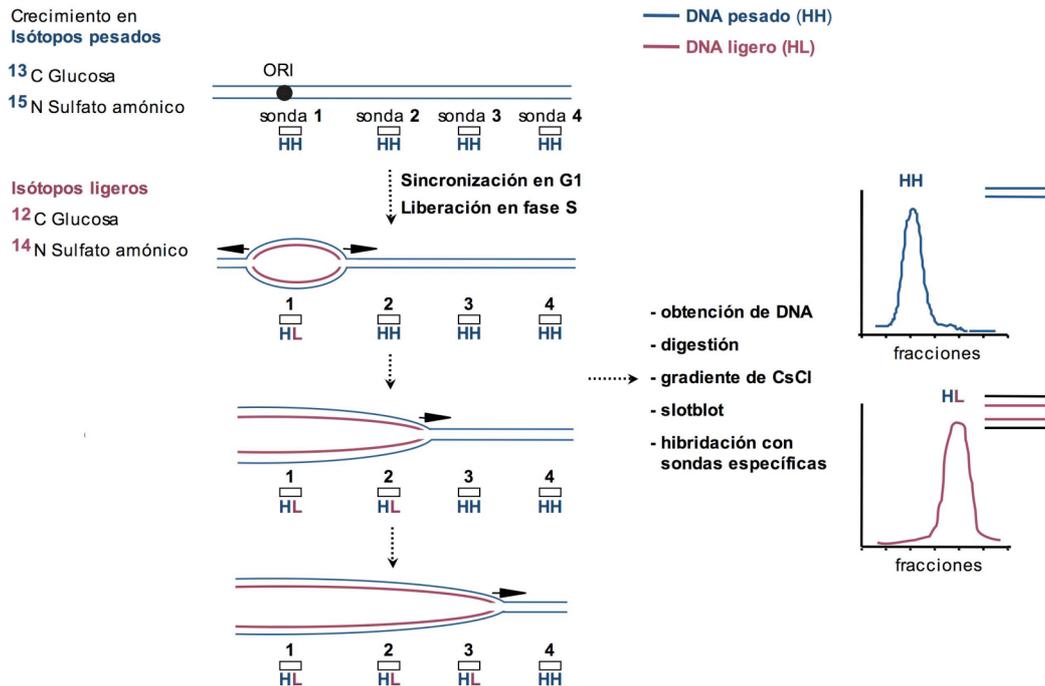


Figura MM2. Esquema del ensayo de sustitución de isótopos de densidad para seguir la progresión de las horquillas de replicación en un determinado replicón.

En estos experimentos se parte de un cultivo celular en fase exponencial crecido durante ocho generaciones en medio mínimo con isótopos pesados (ver Apdo. 4.1), para hacer que todo el DNA sea pesado-pesado (HH). Las células se sincronizan en la fase G1 del ciclo mediante la adición de la feromona factor α y se transfieren posteriormente a un medio con isótopos ligeros, manteniendo el factor α durante 30 min. A continuación, el cultivo se lava con medio fresco y las células se liberan en la fase S en un medio con isótopos ligeros. Dado que la replicación es semiconservativa, el DNA sintetizado a partir de ese momento será pesado-ligero (HL). A lo largo del experimento se toman muestras celulares a distintos tiempos para el análisis mediante citometría de flujo y para la extracción de DNA genómico.

Tras la extracción del DNA, este se digiere con enzimas de restricción y se separa en gradientes de CsCl. Para la preparación de la solución de CsCl, se disuelven 1,28 g de CsCl (Calbiochem) por cada ml de la solución T₁₀-E₁₀₀ (Tris-HCl 10 mM, EDTA 100 mM, pH 7.5; índice de refracción de 1,3395). Una vez disuelto, el índice de refracción final debe ser 1,4052. Tras añadir el DNA a la solución de CsCl, los tubos se centrifugan a 245460 g durante 18 h y posteriormente a 76976 g durante 3,5 h, en ambos casos a 22 °C y con un valor de deceleración 0. Los gradientes se fraccionan usando una bomba peristáltica y un colector de fracciones. Deben obtenerse aproximadamente 60 fracciones con un volumen de 90-95 μl . Para comprobar que el gradiente se ha formado correctamente se mide el índice de refracción de un número significativo de fracciones. Las correspondientes a valores de refracción entre 1,407 y 1,403 se transfieren por succión al vacío a una membrana de nailon cargada

positivamente (Hybond-XL, GE Healthcare) mediante el uso de un *slot blotter*, y se hibridan con sondas específicas marcadas con [α - 32 P]dCTP que reconocen los fragmentos de restricción del replicón analizado. La replicación del DNA se detecta como la transferencia de fragmentos de restricción individuales desde el pico pesado-pesado (HH, no replicado), en el que las dos cadenas del DNA contienen isótopos pesados, al pico pesado-ligero (HL, replicado), donde sólo la nueva cadena del DNA está sustituida con isótopos ligeros.

En los experimentos realizados en esta tesis, la progresión y estabilidad de las horquillas de replicación se examinó en un replicón del cromosoma VI de aproximadamente 70 kb, en el que previamente se habían deletado los orígenes de replicación *ARS608* y *ARS609* (Tercero y Diffley, 2001). La progresión de las horquillas a lo largo de este replicón se siguió a través de seis fragmentos de restricción del cromosoma VI, generados tras la digestión doble con las enzimas *Clal/Sall*. Las señales obtenidas se detectaron mediante la exposición en pantallas sensibles a la radiación (Imaging Plate, Fujifilm), que se leyeron en un escáner Fujifilm Bas 1500, y se cuantificaron empleando el software TINA 2.09. Para calcular el porcentaje de DNA replicado se utilizó el programa NIH Image 1.63 y la ecuación: % replicación = 100 [0,5 HL/HH+0,5 HL], donde HL es el área del pico de DNA pesado-ligero (replicado) y HH el área del pico de DNA pesado-pesado (no replicado).

13. HIBRIDACIÓN DE DNA CON SONDAS RADIOACTIVAS

13.1. Marcaje de sondas de DNA

Todas las sondas empleadas en este tesis y descritas en la Tabla MM4 se obtuvieron mediante PCR, empleando la DNA polimerasa Vent. En cada reacción se marcaron 50 ng de DNA desnaturalizado (hervido previamente durante 10 min) con 50 μ Ci de [α - 32 P]dCTP (6000 Ci/mmol, Pelkin Elmer) mediante la técnica de inserción de nucleótidos al azar, utilizando el *kit* de marcaje de Roche (“Random Primed DNA Labelling Kit”). El marcaje se llevó a cabo a 37 °C durante 30 min. Tras detener la reacción mediante la adición de 2 μ l de EDTA 0,2 M, los nucleótidos no incorporados se retiraron pasando el total de la reacción por microcolumnas de exclusión de Sephadex (G-50, GE Healthcare), siguiendo las instrucciones del fabricante. Justo antes de añadir la sondas marcadas a la solución de hibridación, éstas se hirvieron durante 10 min.

Nombre	Coordenadas	Oligonucleótidos empleados
Sonda 1	198945-199832 del cromosoma VI	5'ARS607/3'ARS607
Sonda 2	211014-211996 del cromosoma VI	VI-2.1/VI-2.2
Sonda 3	218011-218700 del cromosoma VI	VI-3.1/VI-3.3
Sonda 4	240009-240679 del cromosoma VI	VI-5.7/VI-5.8
Sonda 5	243315-244200 del cromosoma VI	VI-6.5/VI-6.6
Sonda 6	260048-261088 del cromosoma VI	ARS609-1/ARS609-2
Sonda ARS305	37896-41821 del cromosoma III	305 deln-5'test (Nº55)/305 deln-3'test (Nº56)
Sonda A	31870-35250 del cromosoma III	probe A 5'/probe A 3'
Sonda B	19773-23910 del cromosoma III	probe B 5'/probe B 3'

Tabla MM4. Sondas de DNA utilizadas en esta tesis.

13.2. Hibridación de DNA

Las membranas se prehibridaron durante 1 h a 65 °C en 10 ó 15 ml de la solución de hibridación (Na₂HPO₄ 400 mM, NaH₂PO₄ 100 mM, EDTA 1 mM, SDS 7%) a la que se añadió DNA de esperma de salmón desnaturalizado a una concentración final de 100 µg/ml. Tras este tiempo se añadieron las sondas marcadas y desnaturalizadas y se incubaron en agitación a 65 °C durante toda la noche. A continuación se realizaron tres lavados de 30 min a 65 °C con la solución: tampón sodio-fosfato 40 mM (stock 0,5 M: Na₂HPO₄ 400 mM, NaH₂PO₄ 100 mM), EDTA 1 mM y SDS 1%. Tras ello, las membranas se expusieron en pantallas sensibles a la radiación (Imaging Plate, Fugifilm), que se leyeron en un escáner Fujifilm Bas 1500, y/o en películas autorradiográficas (Agfa).

13.3. Deshibridación de membranas

Las membranas se deshibridaron cuando fue necesaria su posterior reutilización, para lo que se realizaron dos lavados de 30 min a temperatura ambiente en NaOH 100 mM con agitación fuerte y un lavado suave de 15 min con tampón sodio-fosfato 40 mM.

14. EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS DE *S. cerevisiae*

Se siguió básicamente el método descrito por Foiani y col. (1994), explicado a continuación. Se parte de un cultivo celular en fase exponencial, y se centrifugan 10 ml del mismo durante 3 min a 3000 rpm. El precipitado se resuspende en 0,3 ml de ácido tricloroacético 20%, se transfiere a un tubo eppendorf con 0,3 ml de perlas de vidrio y se agita durante 1 min en el vórtex. La suspensión obtenida se transfiere a un tubo nuevo, mientras que las perlas se lavan dos veces con 0,2 ml de TCA 5% y los lavados se añaden al extracto recogido previamente. Tras ello, el extracto se centrifuga 10 min a 3000 rpm, se descarta el sobrenadante y el precipitado se resuspende en 0,2 ml de tampón Laemmli (stock Laemmli 3X: glicerol 17,4%, β-mercaptoetanol 2,1 M, SDS 9%, Tris-HCl 0,18 M pH 6.8, azul de bromofenol 0,01%). A continuación se añaden 50 µl de Tris Base 1 M para equilibrar el pH (más si fuese necesario). Las muestras se hierven durante 3 min y se centrifugan a 3000 rpm durante 10 min. El sobrenadante se transfiere a un tubo nuevo y se guarda a -20 °C. Todo el proceso se lleva a cabo a temperatura ambiente.

15. ELECTROFORESIS DE PROTEÍNAS Y DETECCIÓN POR INMUNOBLOT

Las proteínas se separaron mediante electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS (SDS-PAGE) al 7,5 ó 10%. Estos geles se corrieron de forma habitual durante 1 h y 45 min a 150 V en tampón TGS (Tris 25 mM, glicina 192 mM, SDS, 0,1% pH 8.3; Biorad), y posteriormente se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (Hybond-ECL, GE Healthcare). Previamente a la transferencia, tanto el gel como la membrana se incubaron con la solución de transferencia (tampón TG de Biorad: Tris 25 mM, glicina 192 mM, pH 8.3, al que se añade SDS 0,0375% y metanol 20%) durante al menos 10 min. Las transferencias fueron semisecas y se desarrollaron regularmente a 15 V durante 30 min, en un aparato de GE-Healthcare. Tras las mismas, las membranas se

tiñeron durante 2 ó 3 min con una solución de Ponceau S (Ponceau S 0,2%, (Sigma); TCA 3%).

Para llevar a cabo los inmunoblots (*Western blots*), las membranas se bloquearon en una solución de leche desnatada en polvo (Nestlé) al 5% en TBST (NaCl 136 mM, KCl 2,68 mM, Tris Base 24 mM, ajustado a un pH final 8,0, Tween-20 0,1%) durante 1 h a temperatura ambiente o bien durante toda la noche a 4 °C. En el caso de Rad53, la proteína se detectó con el anticuerpo policlonal de conejo JDI48 (cortesía del Dr. J. Diffley, Cancer Research UK), a una dilución 1/1000. Cuando las proteínas de interés estaban etiquetadas con el epítipo HA, se detectaron con el anticuerpo monoclonal 12CA5 (stock 3,2 mg/ml), a una dilución 1/400. Para detectar la unión de los anticuerpos primarios se empleó la proteína A conjugada a la peroxidasa de rábano (HRP, GE Healthcare), en el caso de JDI48, y la peroxidasa HRP conjugada con un anticuerpo que reconoce la inmunoglobulina G de ratón (Vector Laboratories), para 12CA5, en ambos casos a una dilución 1/10000. Todas las incubaciones con anticuerpos se realizaron en una solución de leche al 5% en TBST, habitualmente durante 1 h a temperatura ambiente o, en el caso de proteínas de difícil detección, durante toda la noche a 4 °C. Para la detección de las proteínas se emplearon los *kits* de quimioluminiscencia *ECL* o *ECL plus* (GE Healthcare), siguiendo las instrucciones del fabricante. Las exposiciones se realizaron en películas autorradiográficas (Agfa).

16. ENSAYO DE ACTIVIDAD QUINASA *IN SITU* PARA Rad53

Se siguió básicamente el método desarrollado por Pelliccioli y col. (1999). Las muestras proteicas, obtenidas mediante extracción con TCA según lo descrito en el apartado 14, se corrieron en geles de SDS-PAGE al 7,5% durante aproximadamente 2 h y 30 min a 150 V en tampón TGS. Para la transferencia se empleó una membrana de PVDF (Hybond-P, GE Healthcare), previamente sumergida unos segundos en metanol, y se realizó del mismo modo a lo explicado en el apartado 15. Una vez transferidas las proteínas, se llevó a cabo el ensayo *in situ*, que se describe a continuación:

Desnaturalización y renaturalización: La membrana se sumerge durante 1 h a temperatura ambiente en una solución desnaturalizante (cloruro de guanidinio 7 M, DTT 50 mM, EDTA 2 mM, Tris-HCl 50 mM pH 8,0). Después se realizan dos lavados de 10 min con TBS. A continuación, la membrana se incuba en una solución renaturalizante (DTT 2 mM, Tris-HCl 10 mM pH 7,5, NaCl 140 mM, BSA 1%, Tween-20 0,04%) durante 12-18 h a 4 °C, en agitación suave. Tras la incubación, la membrana se lava con Tris-HCl 30 mM durante 30-60 min.

Reacción de quinasa: La membrana se pretrata durante 15 min con el tampón quinasa (DTT 1 M, EGTA 0,1 mM, MgCl₂ 20 mM, MnCl₂ 20 mM, Hepes/NaOH 40 mM pH 8,0, ortovanadato de sodio 100 μM). Tras ello, la solución se reemplaza con un tampón quinasa nuevo al que se añade γ-³²ATP (10 μCi/ml) y se incuba durante 1 h a temperatura ambiente.

Lavados: Se realizan dos lavados de 10 min con Tris-HCl 30 mM pH 7,5, un lavado de 10 min con Tris-HCl 30 mM pH 7,5- Nonidet 0,1%, otro de 10 min con Tris-HCl 30 mM pH 7,5 y un último de 10 min con KOH 1 M. Posteriormente se lava unos

segundos con agua destilada y se hace otro lavado con TCA al 10% durante 10 min. Tras ello, la membrana se lava brevemente con agua destilada y se deja secar a temperatura ambiente durante 15 min.

La señal obtenida se detecta mediante la exposición en películas autorradiográficas (a temperatura ambiente o a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$) y revelado de las mismas, o por medio del empleo de pantallas sensibles a la radiación (Imaging Plate, Fujifilm) y su posterior lectura en un escáner Fujifilm Bas 1500.

17. ENSAYO DE UNIÓN DE PROTEÍNAS A CROMATINA

El protocolo empleado se basó en el descrito inicialmente por Donovan y col. (1997), y modificado posteriormente por Schepers y Diffley (2001). Se parte de 25 ml de un cultivo en fase logarítmica (7×10^6 céls/ml) crecido en medio YPD. Las células se centrifugan durante 3 min a 3000 rpm, se resuspenden en 6,25 ml de una solución: PIPES/KOH 100 mM pH 9.4, DTT 10 mM, y se incuban en agitación durante 10 min a $30\text{ }^{\circ}\text{C}$. A continuación, se centrifugan 3 min a 3000 rpm y se resuspenden en 2,5 ml de YPD con sorbitol 0,6 M y Tris-HCl 25 mM, al que se añaden 30 μl de liticasa (Sigma-Aldrich, 40 KU/ml) y 3 μl de DTT 1 M. Tras ello, se incuban a $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ con agitación suave durante 15-20 min (hasta que se observa al microscopio el 100% de las células como esferoplastos). La formación de esferoplastos se estima a su vez mediante lisis con Triton X-100 1% (PRS Panreac).

A continuación, los esferoplastos se centrifugan 2 min a 2000 rpm. El precipitado se lava tres veces con 400 μl de tampón de lisis (sorbitol 0,4 M, acetato potásico 150 mM, acetato magnésico 2 mM, PIPES/KOH 20 mM pH 6.8, cóctel de inhibidores de proteasas de Roche, Pepstatina A 1 $\mu\text{g/ml}$) y se centrifuga 1 min a 2000 rpm. Tras los lavados, el precipitado se resuspende en 400 μl de tampón de lisis y se añaden 40 μl de Tritón X-100 10%. Se mezcla, se incuba 2 min en hielo y posteriormente se comprueba la lisis al microscopio. Una vez obtenido el lisado celular, se transfieren fracciones de 100 μl del mismo a dos nuevos tubos eppendorf. A uno de ellos se le añade 50 μl de TCA 20%, y se centrifuga a temperatura ambiente durante 5 min a 10000 rpm. El precipitado obtenido se resuspende en 200 μl de tampón Laemmli 1,5X-Tris Base 0,1 M. Esta fracción corresponde al extracto proteico total. Los otros 100 μl del lisado se centrifugan 15 min a 15000 rpm, a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, y se separan el sobrenadante (que se corresponderá a la fracción de proteínas no unidas a cromatina) y el precipitado (fracción cromatínica). El sobrenadante se transfiere a un nuevo tubo y se le añade 100 μl de TCA 20%. Se centrifuga a temperatura ambiente 5 min a 10000 rpm y el precipitado se resuspende en 200 μl de tampón Laemmli 1,5X-Tris Base 0,1 M, con lo que se obtendrán las proteínas no unidas a cromatina. Por otro lado, el primer precipitado (fracción cromatínica) se lava con 400 μl de tampón de lisis y se centrifuga 1 min a 15000 rpm, a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Se elimina el sobrenadante y el precipitado se resuspende en 100 μl de TCA 10%. Se centrifuga durante 5 min a 10000 rpm a temperatura ambiente y el precipitado se resuspende en 200 μl de tampón Laemmli 1,5X-Tris Base 0,1 M, con lo que se obtendrán las proteínas unidas a la cromatina. Una vez resuspendidos los precipitados de las distintas fracciones, se hierven 3 min y se centrifugan 10 min a 3000

rpm, a temperatura ambiente. Finalmente, se recoge el sobrenadante y se guarda a -20 °C hasta su análisis mediante electroforesis SDS-PAGE e inmunoblot.

Cuando se analizó la resistencia a la fuerza iónica de las proteínas de la fracción cromatínica, se separaron dos fracciones de 100 µl del lisado celular inicial y se incubaron 30 min en hielo en presencia de 250 mM NaCl. El resto del protocolo se realizó de igual modo al descrito anteriormente para las muestras sin sal.

18. ENSAYOS DE SENSIBILIDAD AL TRATAMIENTO CON MMS O HU

Las consecuencias del tratamiento con MMS o HU sobre la viabilidad celular se determinaron mediante la siembra por triplicado de aproximadamente 500 células en placas de YPD y el recuento de unidades formadoras de colonias (UFC). Para ello, las muestras celulares correspondientes a los distintos tiempos se diluyeron y sonicaron antes de ser plaqueadas. El recuento de las UFC presentes en la placa se efectuó a los tres días de incubación a 30 °C.

La sensibilidad al MMS se analizó también mediante ensayos de crecimiento en placa en presencia de este compuesto, a partir de diluciones seriadas de cultivos creciendo exponencialmente a una concentración de 1×10^7 céls/ml. El crecimiento se llevó a cabo durante 48-60 h en placas de YP con el correspondiente azúcar.

19. OBSERVACIÓN DE CÉLULAS MEDIANTE MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA

Se parte de un cultivo crecido en medio mínimo suplementado con adenina. Se toma una muestra, se centrifugan las células 3 min a 3000 rpm, a temperatura ambiente, y se resuspenden en un pequeño volumen del mismo medio. Tras ello, se sonicán brevemente y se transfieren 10 µl de las mismas a un portaobjetos tratado con polilisina (BDH), para mejorar la adhesión.

En el caso de las cepas *TUB1-GFP*, las células se visualizaron en un microscopio de fluorescencia Axiovert200 (Zeiss) con un objetivo de inmersión 63x. Las imágenes se capturaron con una cámara monocroma y se procesaron con el software Metamorph. Para la visualización de posibles focos de las proteínas de fusión con GFP se empleó un microscopio invertido Axiovert200 (Zeiss) acoplado a una cámara ccd monocroma y color. El objetivo utilizado en este caso fue el de inmersión 100x, y el procesamiento de las imágenes se llevó a cabo con el mismo tipo de software.

RESULTADOS

1. ANÁLISIS DEL PAPEL DE DIFERENTES RUTAS EN LA REPLICACIÓN CROMOSÓMICA EN CONDICIONES DE DAÑO EN EL DNA

En la primera parte de esta tesis hemos estudiado el papel que tienen diferentes rutas durante la replicación cromosómica en presencia de lesiones en el DNA. Como agente causante de daño en el material genético hemos utilizado el metil metanosulfonato –MMS–, compuesto alquilante empleado de forma habitual en estudios sobre la respuesta celular al daño en el DNA. Algunas rutas, como la reparación por escisión de bases, la recombinación homóloga y la tolerancia al daño mediada por Rad6/Rad18, son esenciales para la resistencia al MMS. Sin embargo, no se había estudiado previamente en detalle la contribución de las mismas a la progresión de las horquillas de replicación en células expuestas a este compuesto, análisis que se ha llevado a cabo en este trabajo.

1.1. La ruta de reparación por escisión de bases es esencial para la progresión de las horquillas de replicación a través de un DNA dañado por MMS

Para estudiar la posible contribución de la ruta de reparación por escisión de bases a la progresión de las horquillas de replicación a través de un DNA alquilado construimos un mutante de delección del gen que codifica la 3-metil-adenina DNA glicosilasa Mag1, *mag1*Δ. Como se ha explicado en la Introducción, esta proteína inicia la ruta de reparación por escisión de bases (BER) para eliminar las lesiones causadas por el MMS, llevando a cabo el corte del enlace glicosídico entre la 3-metil-adenina y la desoxirribosa del azúcar fosfato (Boiteux y Guillet, 2004).

Una vez comprobada la correcta inserción del casete de delección y la viabilidad del mutante *mag1*Δ, estudiamos la cinética de la replicación cromosómica en el mismo por citometría de flujo, en presencia o ausencia de MMS, y analizamos la progresión y estabilidad de las horquillas de replicación mediante experimentos de sustitución de isótopos de densidad. Para ello, se crecieron células *mag1*Δ y del tipo silvestre utilizadas como control en un medio con isótopos pesados (¹³C glucosa y ¹⁵N sulfato amónico), y se sincronizaron en la fase G1 mediante la adición de la feromona factor α. Tras ello, se liberaron en la fase S en un medio con isótopos ligeros, tanto en ausencia como en presencia de MMS. A lo largo del experimento se tomaron muestras para el análisis del contenido en DNA mediante citometría de flujo, para la estimación de la viabilidad celular y para la extracción de DNA genómico.

Los perfiles de citometría de flujo se muestran en la Fig. R1A y R1F. Como se puede observar, cuando las células de ambas cepas se liberan del bloqueo en G1 en ausencia de un agente causante de daño en el DNA, progresan normalmente en la fase S, alcanzando el pico de contenido en DNA 2C a los 60 min, perdiendo a partir de entonces la sincronía. De acuerdo con los resultados obtenidos previamente (Paulovich y Hartwell, 1995; Tercero y Diffley, 2001), cuando las células silvestres se liberan en la fase S en presencia de MMS en el medio, avanzan lentamente a través de la misma y, además, mantienen una elevada viabilidad celular (Fig. R1A, B). En el caso del mutante *mag1*Δ, la entrada de las células en la fase S ocurre aproximadamente al mismo tiempo

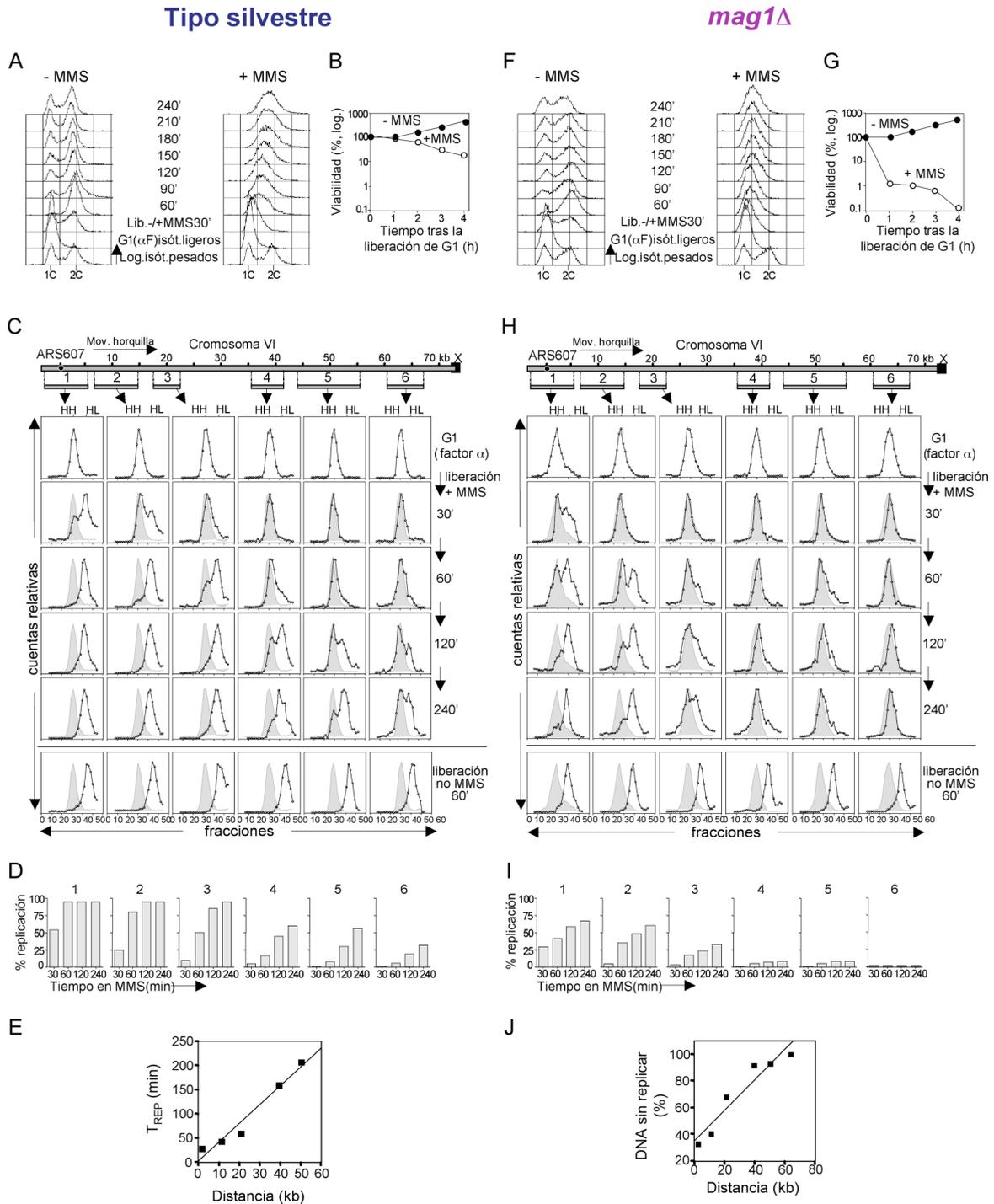


Figura R1. Progresión de las horquillas de replicación y viabilidad celular en el mutante *mag1Δ* en condiciones de daño en el DNA originado por MMS. Las células se sincronizaron en la fase G1 con factor α en medio mínimo con isótopos pesados y se liberaron del bloqueo en un medio con isótopos ligeros, en ausencia y en presencia de MMS (0,033%). A-E: Tipo silvestre (cepa YJT110); F-J: *mag1Δ* (cepa YJT146). (A, F): El contenido de DNA a lo largo del experimento se determinó mediante citometría de flujo a los tiempos indicados en la figura. (B, G): Viabilidad celular. (C, H): La progresión de las horquillas de replicación se analizó en ambas cepas en un replicón del cromosoma VI mediante sustitución de isótopos de densidad, empleando sondas específicas que reconocen los fragmentos de restricción *Clal/Sall* 1-6. Los números de las sondas se corresponden con los números de los fragmentos. Los tiempos indicados se corresponden con los analizados por citometría de flujo. Las señales relativas de radioactividad obtenidas tras la hibridación con cada una de las sondas se representan frente a las fracciones del gradiente de CsCl. En la figura se indican las posiciones de los picos de DNA no replicado (pesado-pesado, HH) y completamente replicado (pesado-ligero, HL). Tras la liberación de las células del bloqueo en G1, la posición del pico inicial HH se muestra por comparación (área gris). (D, I): Cuantificación del porcentaje de replicación de ambas cepas en presencia de MMS, correspondiente a cada fragmento de restricción y tiempo del experimento, y calculado

según la ecuación: % de replicación = $100 [0,5 \text{ HL/HH} + 0,5 \text{ HL}]$, donde HL es el área del pico de DNA pesado-ligero y HH el área del pico de DNA pesado-pesado. (E): Cálculo de la velocidad de desplazamiento de las horquillas de replicación en las células control. En la gráfica se representa la T_{REP} de los cinco primeros fragmentos de restricción (el tiempo en el cual el 50% del fragmento ha sido replicado) frente a la distancia existente entre el punto medio de cada uno de ellos y la secuencia consenso (ACS) del origen de replicación *ARS607*. La pendiente de esta línea da aproximadamente la velocidad de desplazamiento de las horquillas de replicación (260 pb/min). (J): Porcentaje de DNA sin replicar en la cepa *mag1Δ* al final del experimento (240 min tras la liberación de las células de la fase G1 en presencia de MMS). Se representa la cantidad de DNA no replicado de cada fragmento de DNA frente a la distancia existente entre el punto medio de cada uno de ellos y la ACS del origen *ARS607*. La pendiente de esta recta, tras llevar a cabo la regresión lineal, puede emplearse para calcular el valor aproximado del porcentaje de DNA que queda sin replicar en cada posición. A 20 kb de la ACS del origen *ARS607*, el valor estimado es del 58 %.

que en el tipo silvestre, según indican el índice de gemación y los experimentos de transferencia de isótopos de densidad (ver debajo). Sin embargo, el perfil de citometría de flujo (Fig. R1F) indica que las células *mag1Δ* muestran un importante bloqueo en su progresión a través de la fase S cuando son tratadas con MMS e, incluso a los 240 min tras la liberación de G1, permanecen con un contenido de DNA claramente inferior a 2C. Este defecto resulta acompañado de una pérdida bastante significativa de la viabilidad celular en comparación con el tipo silvestre (Fig. R1B y R1G).

La progresión y la estabilidad de horquillas de replicación individuales se analizaron mediante el ensayo de sustitución de isótopos de densidad, en un replicón del cromosoma VI de *S. cerevisiae* de aproximadamente 70 kb, desde el origen temprano *ARS607* hasta el extremo del cromosoma, tal y como se describe en el apartado 12 de Materiales y Métodos. Como se observa en la Fig. R1C y R1H (fila superior), los seis fragmentos de DNA analizados están situados en el pico correspondiente al DNA pesado-pesado (HH, no replicado) en células sincronizadas en la fase G1. A los 60 min tras la liberación de las células en la fase S en un medio con isótopos ligeros y en ausencia de MMS, todos los fragmentos se replican y presentan un pico de DNA pesado-ligero (HL, replicado), tanto en células de tipo silvestre como en mutantes *mag1Δ* (Fig. R1C y H, fila inferior), de acuerdo con la citometría de flujo (Fig. R1A y R1F), que muestra que la gran parte de la síntesis de DNA se completa en este tiempo. Cuando las células silvestres se liberan en la fase S en presencia de MMS, el fragmento 1, que contiene el origen *ARS607*, se desplaza mayoritariamente hacia el pico de DNA HL a los 30 min (Fig. R1C, fila 2) y el fragmento 2 muestra una proporción significativa de DNA HL, lo que indica que dicho origen se ha activado y que la replicación ha comenzado. A lo largo del tiempo se puede observar que las horquillas de replicación avanzan de izquierda a derecha en el replicón estudiado: por ejemplo, el fragmento 3 presenta un pico de DNA HL a los 60 min, y la replicación de los fragmentos 4-6 se produce de manera progresiva a tiempos más tardíos (los datos están cuantificados en la Fig. R1D). Así, los resultados obtenidos indicaron que las horquillas de replicación se mueven lentamente en las células de tipo silvestre (aproximadamente a 260 pb/min; calculado según lo descrito en Materiales y Métodos a partir de los datos de la Fig. R1E) pero de forma estable a través del DNA dañado, de acuerdo con lo descrito previamente (Tercero y Diffley, 2001).

En las células mutantes *mag1Δ*, el fragmento 1 también presenta un pico de DNA pesado-ligero (HL, replicado) a los 30 min tras la liberación en la fase S en presencia de MMS (Fig. R1H), lo que indica que el origen *ARS607* se ha activado y que la replicación comienza aproximadamente al mismo tiempo que en el tipo silvestre. Sin embargo, a diferencia de lo observado en la cepa control, el fragmento 2 permanece en

el pico de DNA HH a los 30 min, y la replicación del fragmento 1 requiere más tiempo que en el tipo silvestre y no parece llegar a completarse, lo que sugiere que la progresión de las horquillas de replicación es mucho menos eficiente en el mutante *mag1Δ*. A los 60 min se puede detectar el desplazamiento de izquierda a derecha de las horquillas de replicación, desde el fragmento 1 al 3, pero dicho movimiento es claramente mucho más lento que el observado en las células silvestres. Así, mientras que en estas últimas los fragmentos 1 y 2 aparecen completamente replicados a los 60 min (Fig. R1C, fila 3), en las células *mag1Δ* solo aproximadamente el 42% y 35% de las horquillas de replicación atraviesan dichos fragmentos, respectivamente. De igual modo, en este punto del experimento, se detecta más del 50% de replicación en el fragmento 3 de la cepa silvestre, mientras que solo se observa un pequeño porcentaje de replicación en el mutante *mag1Δ*. Incluso a los 120 y 240 min, no se ha completado la replicación del fragmento 3, y prácticamente no hay DNA replicado en los fragmentos 4-6 (Fig. R1H, filas 4 y 5; datos cuantificados en Fig. R1I). Estos resultados sugieren que la mayoría de las horquillas de replicación se detienen o colapsan antes de atravesar el fragmento 3 en las células *mag1Δ*.

El tamaño medio de un replicón en *S. cerevisiae* es de 40 kb, por lo que una horquilla de replicación replica como media unas 20 kb. Los datos derivados de estos experimentos permiten estimar que, en el mutante *mag1Δ*, a los 240 min de la liberación de las células en la fase S en presencia de MMS, aproximadamente el 60% de las horquillas de replicación se detienen antes de desplazarse 20 kb desde el origen *ARS607* (Fig. R1J). Por tanto, cuando las células son tratadas con MMS durante la fase S en ausencia de la glicosilasa Mag1, las horquillas de replicación se forman e inician la replicación del DNA, pero su progresión se encuentra dramáticamente afectada. Los resultados obtenidos permiten concluir que el DNA alquilado necesita ser reparado continuamente por la ruta de reparación por escisión de bases durante la fase S para hacer posible la progresión de las horquillas de replicación y el mantenimiento de la viabilidad celular.

1.2. La ruta de recombinación homóloga es necesaria para la progresión eficiente de las horquillas de replicación en presencia de daño en el DNA causado por MMS

Seguidamente, quisimos analizar la importancia de la ruta de recombinación homóloga para la progresión de las horquillas de replicación en presencia de MMS. Para ello, construimos un mutante nulo de *RAD52*, *rad52Δ*, según se describe en Materiales y Métodos, eliminando así el proceso de recombinación homóloga del DNA. Tras la obtención y comprobación de la viabilidad de la cepa *rad52Δ*, llevamos a cabo el mismo tipo de experimentos descritos en el caso del mutante de la glicosilasa Mag1.

Las células *rad52Δ* se crecieron en un medio con isótopos pesados, se bloquearon en la fase G1 del ciclo y se liberaron en la fase S en un medio con isótopos ligeros, en ausencia y en presencia de MMS, durante 4 h. Como se observa en el análisis llevado a cabo mediante citometría de flujo (Fig. R2A), estas células progresan en el ciclo celular en ausencia de daño en el DNA. Sin embargo, no lo hacen normalmente en la fase S cuando son tratadas con MMS, y no alcanzan el pico de contenido de DNA 2C.

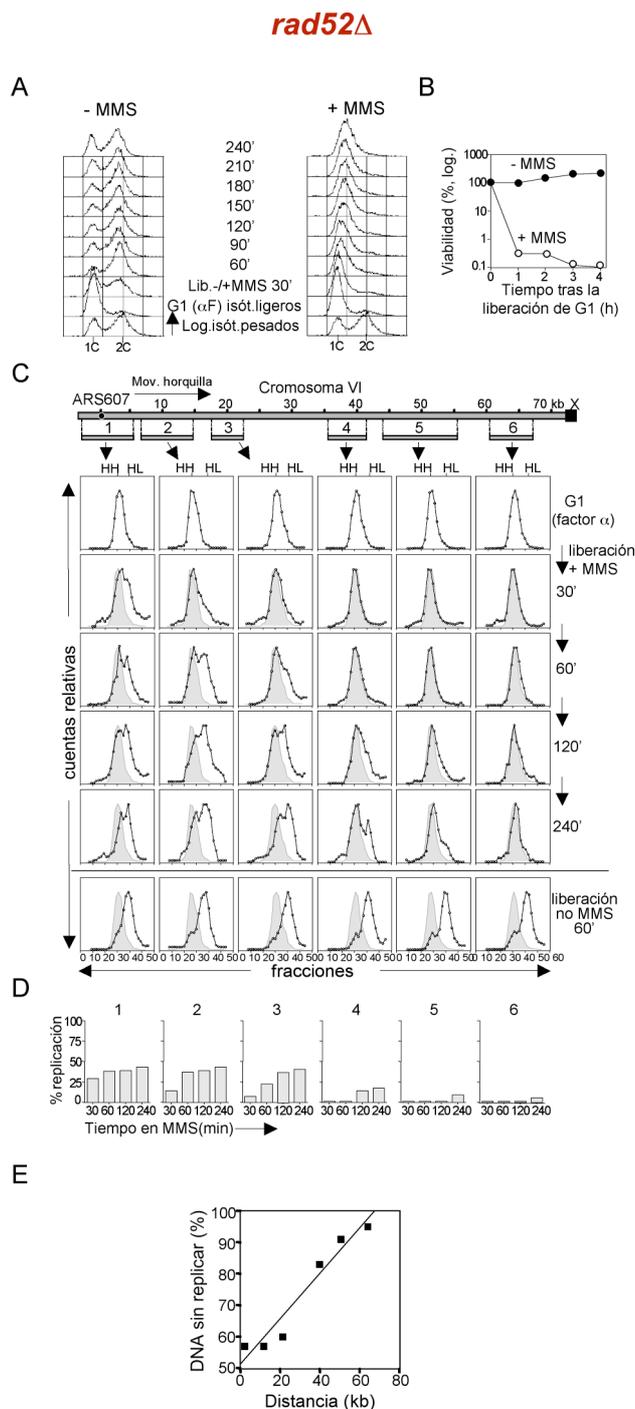


Figura R2. Progresión de las horquillas de replicación y viabilidad celular en el mutante *rad52Δ* en condiciones de daño en el DNA originado por MMS. Los detalles experimentales y de la representación de los resultados son iguales a los descritos en la Figura R1. Las células del mutante *rad52Δ* (cepa YJT144) se bloquearon con factor α en la fase G1 en un medio mínimo con isótopos pesados y, tras ello, se liberaron en un medio con isótopos ligeros en ausencia y en presencia de MMS (0,033%). (A): Perfil de citometría de flujo. (B): Viabilidad celular del mutante *rad52Δ*, en ausencia y en presencia de MMS, a lo largo del experimento. (C): La progresión de las horquillas de replicación en el replicón del cromosoma VI se analizó por medio de sustitución de isótopos de densidad, como se describe en la Figura R1. (D): Cuantificación del porcentaje de replicación en presencia de MMS, correspondiente a cada fragmento de restricción y tiempo del experimento. (E): Porcentaje de DNA que permanece sin replicar a los 240 min tras la liberación de las células *rad52Δ* en presencia de MMS. El valor estimado a una distancia de 20 kb del ACS del origen *ARS607* es del 65%.

Además, esta situación va acompañada de una notable pérdida de la viabilidad celular (Fig. R2B). El defecto en la progresión en la fase S no se debe a un retraso en la

entrada en la misma, ya que el origen *ARS607* se activa al mismo tiempo que en las células del tipo silvestre (ver ensayos de sustitución de isótopos de densidad, Fig. R2C) y el índice de gemación no muestra diferencias significativas con respecto al obtenido en ausencia de MMS.

La progresión de las horquillas de replicación se analizó mediante experimentos de sustitución de isótopos de densidad, del mismo modo a lo descrito en el apartado 1.1 (Fig. R2C). En las células *rad52Δ* sincronizadas en la fase G1 del ciclo, todos los fragmentos de restricción muestran picos de DNA no replicado, HH (fila superior) y, a los 60 min tras la liberación en un medio con isótopos ligeros en ausencia de daño en el DNA, dichos picos se desplazan hacia la posición del DNA replicado, HL (fila inferior). Cuando las células se liberan en presencia de MMS, el fragmento 1 presenta un pico de DNA pesado-ligero (HL) a los 30 min, lo que indica que el origen *ARS607* se ha activado, y se detecta también un pequeño pero significativo porcentaje de replicación en el fragmento 2. A los 60 min, solo el 40% de las horquillas han atravesado los fragmentos 1 y 2, y únicamente el 22% de ellas llega más allá del fragmento 3 (datos cuantificados en la Fig. R2D). A los 120 y 240 min, el porcentaje de horquillas de replicación que se desplaza a través de los fragmentos 1 y 2 apenas aumenta ligeramente. A los 240 min, solo un 40% de las horquillas ha atravesado el fragmento 3 (Fig. R2C, fila 5), a diferencia de lo observado en las células silvestres, en las cuales este fragmento se encuentra totalmente replicado a los 120 min (Fig. R1C). Nuestros cálculos indican que, en ausencia de Rad52, aproximadamente el 65% del DNA permanece sin replicar a una distancia de 20 kb del origen *ARS607* (Fig. R2E). Por tanto, un elevado porcentaje de las horquillas resultan bloqueadas o colapsadas en el mutante *rad52Δ* a lo largo de la distancia media de avance de las mismas. Los resultados obtenidos muestran por tanto que la progresión de las horquillas de replicación a través de un DNA dañado por alquilación se encuentra muy afectada en ausencia de la recombinación homóloga.

1.3. La progresión de las horquillas de replicación a través de un DNA dañado por alquilación es defectiva en ausencia de la ruta *RAD6/RAD18* de tolerancia al daño en el material genético

A continuación examinamos el posible papel de la ruta de tolerancia al daño (DDT) mediada por el complejo Rad18/Rad6 en el desplazamiento y estabilidad de las horquillas de replicación cuando las células son tratadas con MMS. Como se ha explicado en el apartado 1.4.6 de la Introducción, la formación de dicho complejo proteico es fundamental para la activación de las diferentes subramas de la vía DDT, lo que permite la replicación a través de lesiones en el material genético sin reparar que bloquean las DNA polimerasas. Con el objetivo de suprimir completamente la actuación de esta ruta, construimos un mutante nulo de *RAD18*, *rad18Δ*, y seguidamente analizamos en el mismo la progresión de las horquillas de replicación en presencia de daño en el DNA originado por MMS, de igual modo a lo descrito en los apartados 1.1 y 1.2. Las células *rad18Δ* se crecieron en un medio con isótopos pesados, se sincronizaron en la fase G1 del ciclo con factor α , y se liberaron del bloqueo en un medio con isótopos ligeros. Como muestra el perfil de citometría de flujo (Fig. R3A), mientras que estas células progresan normalmente en el ciclo celular en ausencia de

daño en el DNA, cuando se tratan con MMS no son capaces de avanzar a través de la fase S y, además, sufren una importante pérdida de viabilidad (Fig. R3B).

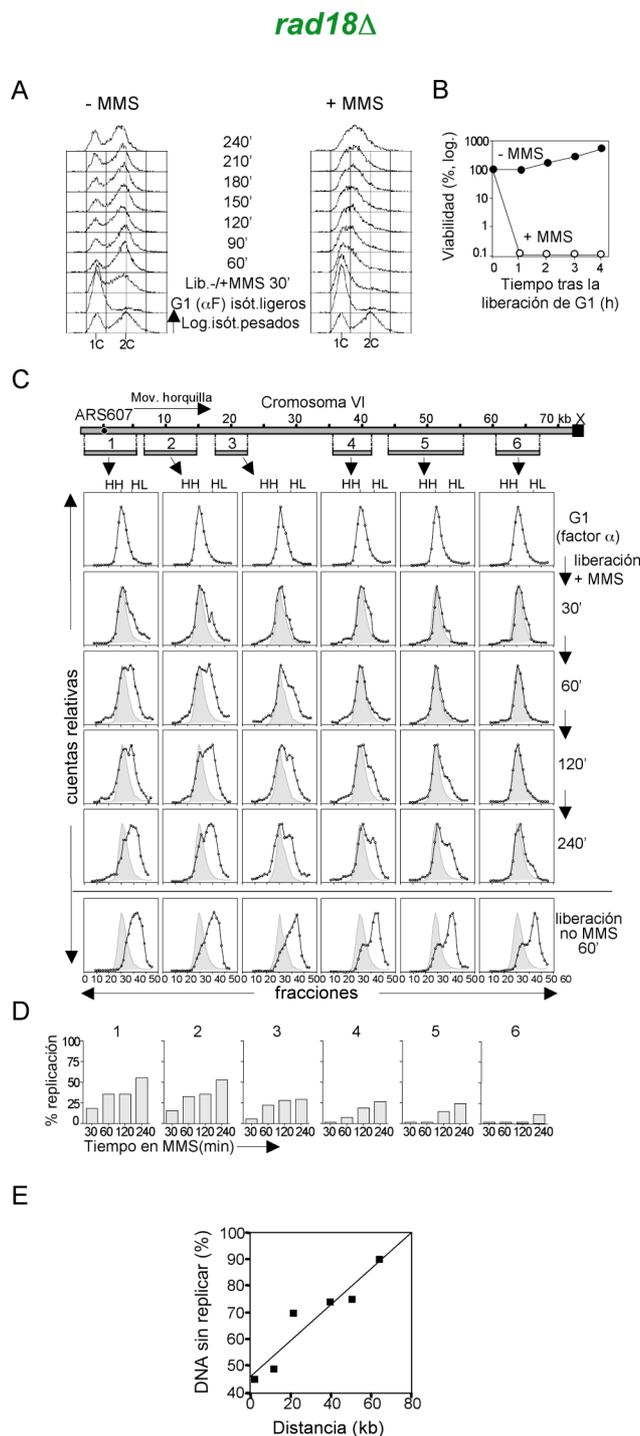


Figura R3. Progresión de las horquillas de replicación y viabilidad celular en las células *rad18Δ* en condiciones de daño en el DNA originado por MMS. Los detalles son iguales a los descritos en la Figura R1. (A): Perfil de citometría de flujo de las células *rad18Δ* (cepa YJT117). (B): Viabilidad celular. (C): Análisis de la progresión de las horquillas de replicación en el mutante *rad18Δ* mediante sustitución de isótopos de densidad. (D): Cuantificación del porcentaje de replicación para cada fragmento y tiempo del experimento. (E): Cálculo del porcentaje de DNA que permanece sin replicar al final del experimento en las células *rad18Δ*. El valor estimado a 20 kb del ACS del origen ARS607 es del 61%.

Al llevar a cabo los experimentos de sustitución de isótopos de densidad en este mutante (Fig. R3C) observamos que, a los 60 min tras la liberación de las células del

bloqueo en G1 en ausencia de MMS, todos los fragmentos presentan picos de DNA pesado-ligero, HL, replicado (fila inferior). Aunque en este punto se detecta un pequeño porcentaje de DNA HH, no replicado, esto probablemente refleja un leve defecto en la progresión de las horquillas de replicación en este mutante, incluso en ausencia de daño en el material genético. Cuando las células se liberan en la fase S en presencia de MMS, la progresión de las horquillas de replicación es mucho más lenta que en las células del tipo silvestre (Fig. R1C), y muestra un defecto similar al observado en las células *rad52Δ* (Fig. R2C). A los 30 min tras la liberación de G1, solo un pequeño porcentaje de las horquillas atraviesa los fragmentos 1 y 2, lo que indica que, aunque el origen *ARS607* se ha activado, las horquillas de replicación se desplazan muy despacio o que algunas de ellas se detienen o colapsan. La replicación avanza lentamente de izquierda a derecha y, a los 60 min en presencia de MMS, solo aproximadamente el 23% de las horquillas ha atravesado el fragmento 3, y menos del 40% de las mismas se ha desplazado a través de los fragmentos 1 y 2 (Fig. R3C, fila 3; datos cuantificados en Fig. R3D). A los 120 min solo se observa un pequeño incremento en la replicación de todos los fragmentos y, a los 240 min, menos del 10% de las horquillas ha alcanzado el final del replicón. Calculamos que, en este punto, más del 60% de las horquillas se detienen o colapsan antes de atravesar las primeras 20 kb desde el origen (Fig. R3E). Estos resultados indican que la ruta de tolerancia al daño dependiente de Rad18 ejerce un importante papel cuando el DNA está dañado por alquilación, haciendo posible la progresión de las horquillas de replicación.

1.4. Los efectos de la ausencia de la recombinación homóloga y de los mecanismos de tolerancia al daño en el DNA sobre la progresión de las horquillas de replicación en presencia de MMS son aditivos

Dado que la progresión de las horquillas de replicación en presencia de MMS se encuentra afectada de un modo similar en los mutantes *rad52Δ* y *rad18Δ*, nos preguntamos si Rad52 y Rad18 actúan como alternativas para permitir el avance de las horquillas a través de un DNA dañado, o bien contribuyen independientemente a este proceso. Para ello, construimos el doble mutante *rad52Δrad18Δ* y, a pesar de mostrar un importante defecto en el crecimiento, como ya estaba descrito en la literatura, pudimos realizar el mismo tipo de ensayos llevados a cabo con los mutantes simples. De este modo, las células se crecieron en un medio con isótopos pesados, se sincronizaron en la fase G1 con factor α y después se liberaron del bloqueo en un medio con isótopos ligeros, tanto en ausencia como en presencia de MMS. El perfil de citometría de flujo (Fig. R4A) revela que, como se esperaba, existe un importante defecto en la progresión de estas células a través de la fase S en presencia de MMS, que va acompañado de una dramática pérdida de la viabilidad celular (Fig. R4B).

La progresión de las horquillas de replicación fue analizada mediante el ensayo de sustitución de isótopos de densidad (Fig. R4C), como en los mutantes descritos anteriormente. A los 60 min tras la liberación del bloqueo en G1 en ausencia de MMS, existe un importante porcentaje de DNA sin replicar (Fig. R4C, fila inferior), lo que sugiere que, incluso en ausencia de daño en el DNA, la progresión de las horquillas de

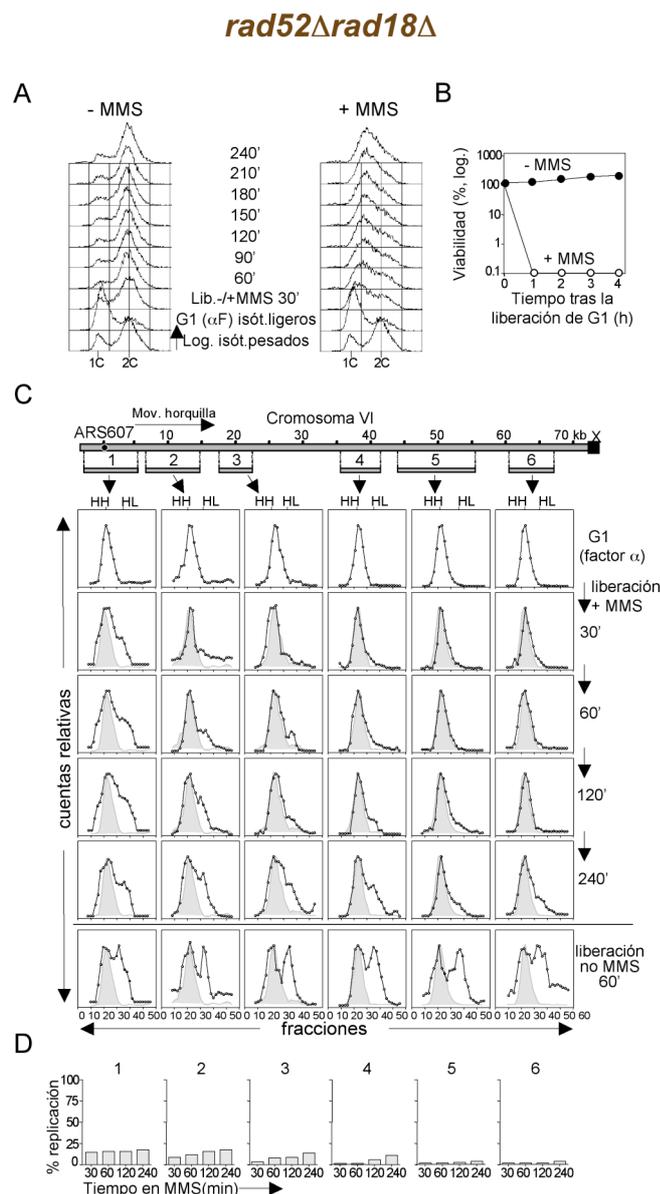


Figura R4. Progresión de las horquillas de replicación y viabilidad celular en el doble mutante *rad52Δ rad18Δ* en condiciones de daño en el DNA originado por MMS. Los detalles son iguales a los descritos en la Figura R1. (A): Perfil de citometría de flujo de las células *rad52Δ rad18Δ* (cepa YJT157). (B): Viabilidad celular. (C): Análisis de la progresión de las horquillas de replicación mediante sustitución de isótopos de densidad. (D): Cuantificación del porcentaje de replicación.

replicación en este doble mutante es altamente defectiva, lo cual podría explicar, al menos en parte, el defecto en el crecimiento de estas células. Tras 30 min en la fase S en presencia de MMS, se observa un pico de DNA HL, replicado, en el fragmento 1, lo que indica que el origen *ARS607* se ha activado y que la replicación se ha iniciado desde el mismo (fila 2). Sin embargo, la cantidad de DNA replicado no aumenta significativamente a lo largo del experimento. Además, como se observa en la figura, la progresión de las horquillas de replicación en este doble mutante muestra un defecto mayor que en los mutantes simples *rad52Δ* o *rad18Δ*. Incluso a los 240 min, solo se observa un pequeño porcentaje de replicación en los fragmentos 2-4 (Fig. R4C, fila inferior y Fig. R4D). Estos datos sugieren una situación terminal para las horquillas de replicación, en la que más del 80% de las mismas se bloquean o colapsan antes de su avance en las primeras 20 kb del replicón. Los resultados obtenidos con el mutante

doble *rad52Δrad18Δ* indican que la replicación del DNA en presencia de MMS se encuentra aún más afectada que en los mutantes simples *rad52Δ* o *rad18Δ*. Por tanto, podemos concluir que Rad52 y Rad18 contribuyen de un modo independiente a la progresión de las horquillas de replicación en presencia de daño en el material genético.

1.5. El *checkpoint* de la fase S es funcional en los mutantes *mag1Δ*, *rad52Δ* y *rad18Δ*

Los experimentos presentados hasta el momento muestran que los mutantes *mag1Δ*, *rad52Δ* y *rad18Δ* manifiestan importantes defectos en la progresión de las horquillas de replicación cuando las células son tratadas con MMS. Con el objetivo de atribuir con seguridad estos defectos a la ausencia de las rutas estudiadas, y no a un fallo en el funcionamiento del *checkpoint* de la fase S que podría enmascarar los resultados, dado que en ausencia del mismo las horquillas de replicación colapsan cuando existe daño en el DNA (Tercero y Diffley, 2001), examinamos si dicho *checkpoint* se encontraba activo en los mutantes analizados.

Al final del cromosoma VI, en posición subtelomérica, se localiza un origen de replicación “durmiente”, asociado al elemento X. Este origen, normalmente inactivo, se activa en presencia de MMS en mutantes del *checkpoint* (Tercero y Diffley, 2001). El hecho de no detectar replicación procedente de este extremo del cromosoma en nuestros experimentos de sustitución de isótopos de densidad en las células de tipo silvestre, ni en los mutantes *mag1Δ*, *rad52Δ* y *rad18Δ* (Figs. R1C, R1H, R2C, R3C y R4C) indica que la activación del elemento X está inhibida por Mec1/Rad53 y, por tanto, que el *checkpoint* se activa en respuesta al tratamiento con MMS en todas estas cepas.

Con el fin de corroborar que el *checkpoint* es funcional en los mutantes estudiados, analizamos el estado de la fosforilación y la actividad quinasa de Rad53 en todos ellos, tanto en presencia como en ausencia de MMS. Como se ha mostrado previamente, Rad53 se hiperfosforila durante la activación del *checkpoint* de la fase S. Además, esta hiperfosforilación es necesaria para la obtención de su propia actividad quinasa, lo que le confiere capacidad de autofosforilarse (Sanchez y col., 1996; Sun y col., 1996). Para realizar estos análisis, las células de la cepa silvestre y de cada uno de los mutantes se sincronizaron en la fase G1 con factor α y se liberaron en la fase S en ausencia y en presencia de MMS. A lo largo del experimento se tomaron muestras celulares, a intervalos de 30 min, para la extracción de proteínas y su posterior análisis mediante inmunoblot. Como se muestra en la Fig. R5A-E (panel superior), Rad53 se hiperfosforila en todas las cepas, con el consiguiente retraso en su migración en gel, específicamente durante la fase S del ciclo y solo en presencia de MMS. Para confirmar que la hiperfosforilación de Rad53 en estos experimentos le confiere actividad quinasa, las mismas muestras proteicas se emplearon para llevar cabo ensayos de actividad quinasa *in situ*, que permiten medir la autofosforilación de Rad53 mediante la incorporación de γ -ATP marcado radioactivamente (Pelliccioli y col., 1999). Los resultados obtenidos en estos ensayos (Fig. R5A-E, panel inferior) indicaron que la fosforilación de Rad53 se correlaciona en todos los casos con la adquisición de su actividad quinasa, siendo capaz de autofosforilarse solo en las células que se liberan en la fase S en presencia de MMS.

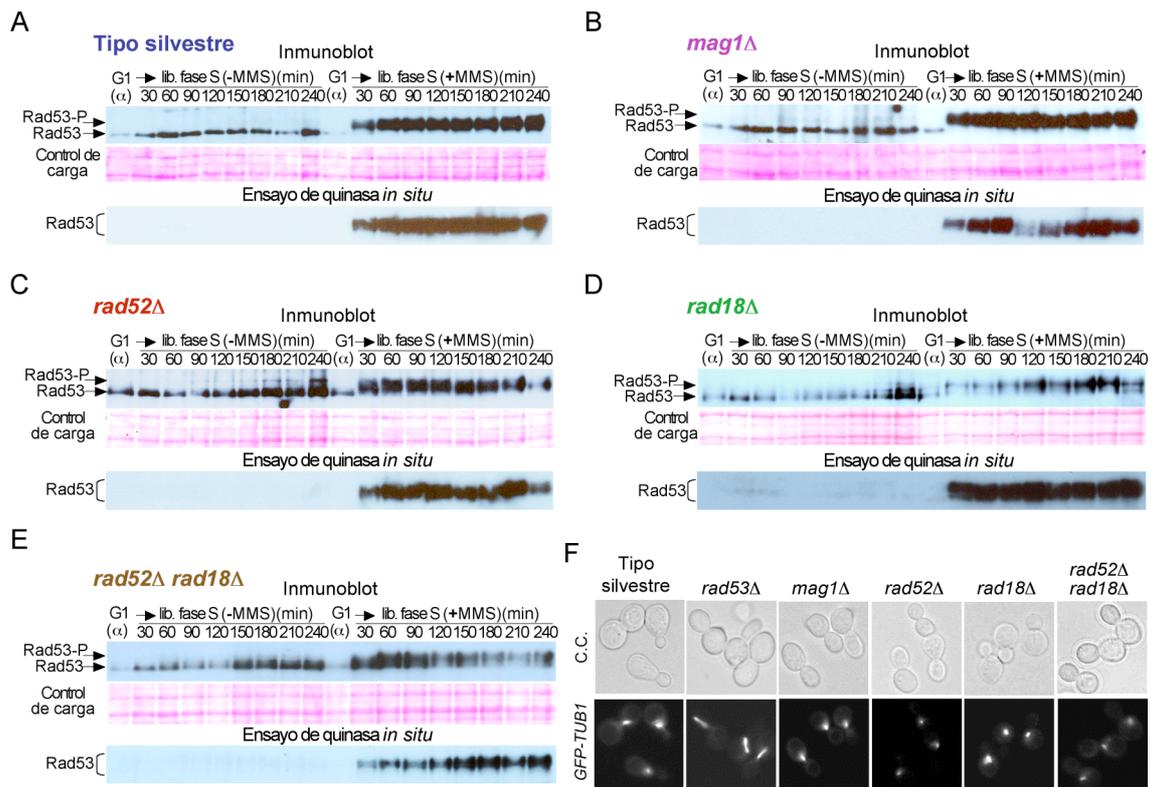


Figura R5. Actividad del checkpoint de la fase S en los mutantes *mag1Δ*, *rad52Δ*, *rad18Δ* y *rad52Δ rad18Δ*. : (A-E): Panel superior: Immunoblots de Rad53. Se identificaron las formas no fosforilada (Rad53) y fosforilada (Rad53-P) de esta proteína. La región de la membrana correspondiente a la migración de la proteína en el gel, teñida con Ponceau S, se muestra como control de carga. Panel inferior: Ensayos de actividad quinasa *in situ*. La autofosforilación de Rad53 se midió mediante la incorporación de γ - 32 P-ATP. Las muestras proteicas se corresponden con las analizadas mediante inmunoblot. (A) Tipo silvestre, (B) *mag1Δ*, (C) *rad52Δ*, (D) *rad18Δ* y (E) *rad52Δ rad18Δ*. Las cepas fueron las mismas que las utilizadas en los experimentos anteriores. (F): Estudio de la elongación del huso mitótico mediante microscopía de fluorescencia. Las células se bloquearon en la fase G1 y se liberaron en la fase S en presencia de MMS (0,033%) durante 2 h. Las imágenes muestran el estado del huso mitótico en las células del tipo silvestre *TUB1-GFP* (cepa YJT126), *rad53Δsm11ΔTUB1-GFP* (cepa YJT127), *mag1ΔTUB1-GFP* (cepa YVR7), *rad52ΔTUB1-GFP* (cepa YVR6), *rad18ΔTUB1-GFP* (cepa YVR5) y *rad52Δrad18ΔTUB1-GFP* (cepa YJT158).

Adicionalmente, y puesto que una de las funciones del *checkpoint* de la fase S es inhibir la elongación del huso mitótico cuando existen perturbaciones durante la replicación del DNA, quisimos examinar si esta inhibición ocurría en los mutantes analizados. Para ello, se integró en cada uno de ellos y en la cepa silvestre el gen de la tubulina (*TUB1*) fusionado al de la proteína fluorescente verde (*GFP*). También se construyó la cepa *rad53Δsm11ΔTUB1-GFP* para emplearla como control de un *checkpoint* defectivo. La delección del gen *SML1* hace posible la viabilidad del mutante *rad53Δ* (Zhao y col., 1998). Las células se bloquearon en la fase G1 con factor α y se liberaron en la fase S en presencia de MMS, durante 2 h. Seguidamente, se analizó la elongación del huso mitótico mediante microscopía de fluorescencia. Las imágenes obtenidas muestran que, al igual que se observa en las células silvestres, y a diferencia de lo que ocurre en el mutante del *checkpoint* *rad53Δ*, que no es capaz de inhibir la mitosis aunque la replicación del DNA no se haya completado, la elongación del huso mitótico se encuentra inhibida en los mutantes *mag1Δ*, *rad52Δ*, *rad18Δ* y *rad52Δrad18Δ* (Fig. R5F), confirmando de nuevo que el *checkpoint* está activo en todas las cepas y que previene la entrada en mitosis en presencia de MMS.

En resumen, el *checkpoint* de la fase S, mediado por Mec1 y Rad53, es funcional en todos los mutantes analizados en este trabajo. Por tanto, los defectos observados en la progresión de las horquillas de replicación no reflejan un fallo en la respuesta del *checkpoint* sino que son debidos a la ausencia de la reparación por escisión de bases, de la recombinación homóloga y de las rutas de tolerancia al daño en el DNA.

1.6. Reversibilidad de los efectos del MMS durante la fase S en los mutantes *mag1Δ*, *rad52Δ* y *rad18Δ*

Los resultados descritos anteriormente sugieren que un número considerable de horquillas de replicación se bloquean o colapsan cuando las células son tratadas con MMS en ausencia de Mag1, Rad52 o Rad18. Con el objetivo de profundizar en el conocimiento de las implicaciones funcionales de estos defectos, examinamos la reversibilidad de esta situación. Para ello desarrollamos dos tipos de abordajes: en el primero de ellos, las células se trataron con MMS durante un cierto tiempo, tras el cual la droga se eliminó del medio; en el segundo abordaje, las células se trataron de igual modo pero la expresión de la proteína de interés se indujo selectivamente tras la eliminación del MMS.

1.6.1. Estudios de reversibilidad (I): eliminación del agente causante del daño en el DNA

Para llevar a cabo estos ensayos, las células del tipo silvestre y de cada uno de los mutantes se bloquearon con factor α en la fase G1. Una vez sincronizados, cada cultivo se liberó del bloqueo en un medio fresco, en ausencia y en presencia de MMS. Transcurrida 1 h, tiempo suficiente para observar efectos claros del MMS, el cultivo tratado con este compuesto se dividió en dos, y en uno de ellos el agente alquilante se eliminó del medio. A partir de muestras celulares tomadas a lo largo del experimento se examinaron, en todos los casos, la progresión de las células a través de la fase S mediante citometría de flujo, los efectos ocasionados en la viabilidad celular a través del recuento de unidades formadoras de colonias en placa y el estado del *checkpoint* por medio del análisis de la fosforilación de Rad53.

Los resultados obtenidos indicaron que, en presencia de MMS en el medio, las células silvestres avanzan lentamente a través de la fase S, como muestra el perfil de citometría de flujo (Fig. R6A). Cuando el agente alquilante se elimina del medio tras 1 h de actuación, las células progresan más rápidamente en la fase S. Al no producirse más lesiones, una vez que la droga se retira del medio, los obstáculos generados previamente son eliminados. Estas células muestran una elevada viabilidad celular tras 1 h en presencia de MMS, que se mantiene en los tiempos siguientes con algún incremento después de retirar la droga del medio. Además, el hecho de que Rad53 permanezca fosforilada incluso a las 2 h tras la eliminación del MMS (inmunoblot, Fig. R6A), indica que el avance observado en la fase S mediante citometría de flujo puede atribuirse al restablecimiento de las horquillas anteriormente dañadas y no a la activación de nuevos orígenes de replicación, que estarían siendo inhibidos por medio de la actuación del *checkpoint* de la fase S. La fosforilación de Rad53 a las 2 h tras la

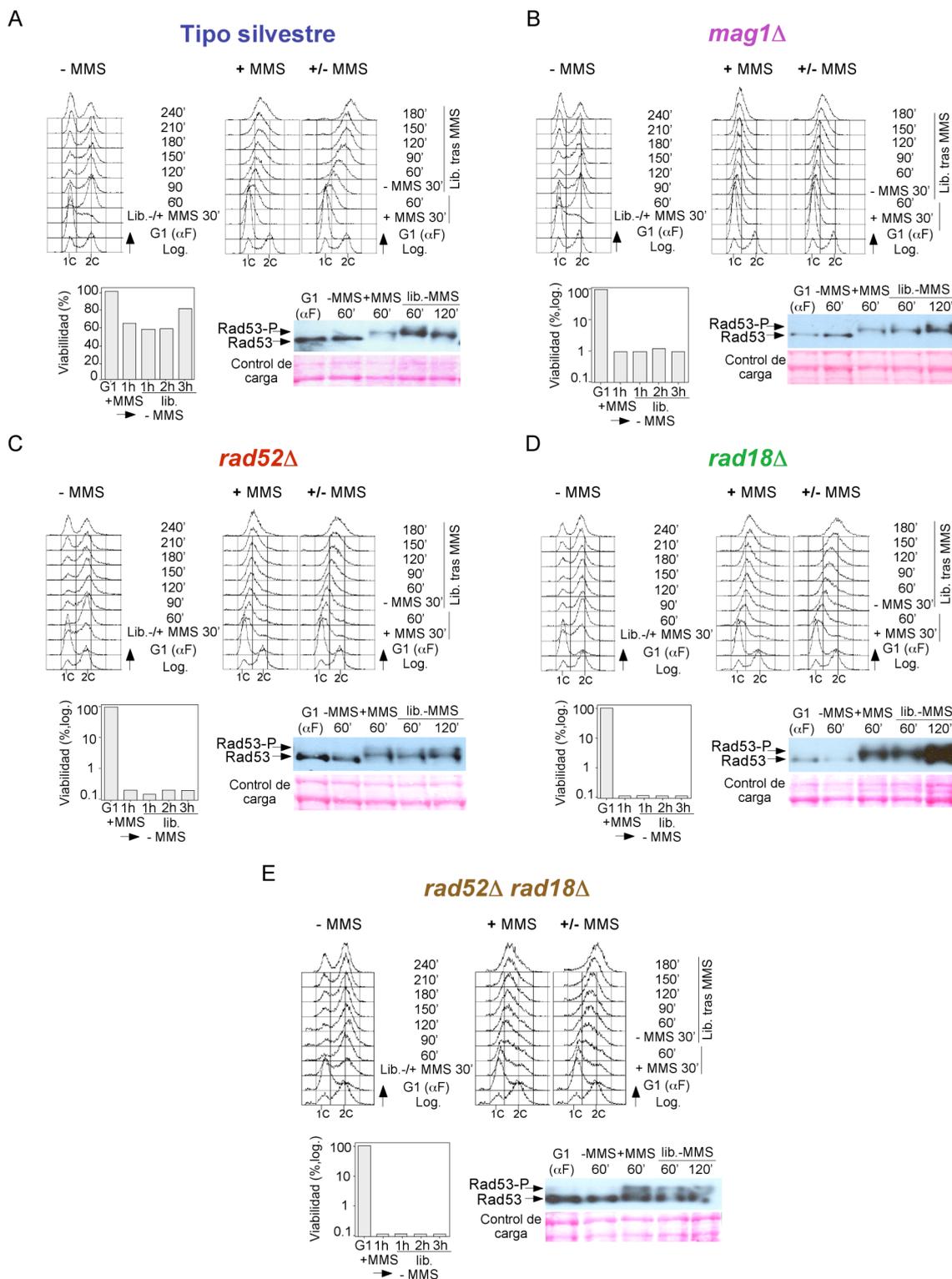


Figura R6. Estudios de reversibilidad (I). Análisis del efecto de la eliminación del MMS del medio en la progresión de las células en la fase S y en la viabilidad celular. Las células se crecieron en un medio mínimo y se bloquearon en la fase G1 con factor α . Posteriormente, se liberaron del bloqueo en un medio fresco, en ausencia y en presencia de MMS (0,033%). Tras 60 min, el cultivo con MMS se dividió en dos y en uno de ellos la droga se eliminó del medio. El contenido en DNA fue determinado mediante citometría de flujo a partir de muestras tomadas en el transcurso del experimento. La viabilidad celular se estudió a los tiempos indicados en la figura. El estado de activación de Rad53 se analizó mediante inmunoblot, a partir de muestras tomadas a lo largo del experimento. La zona de la membrana correspondiente a la migración de Rad53 se muestra como control de carga tras su tinción con Ponceau S. (A) tipo silvestre, (B) *mag1Δ*, (C) *rad52Δ*, (D) *rad18Δ* y (E) *rad52Δ rad18Δ*. Las cepas fueron las mismas que las utilizadas en los experimentos de las Figuras R1-5.

eliminación del MMS indica también que, incluso en células del tipo silvestre, permanecen algunas lesiones en el DNA que provocan que el *checkpoint* esté activado.

En contraste, en el caso del mutante *mag1* Δ (Fig. R6B), la eliminación del MMS tras 1 h de actuación no produce un avance significativo de las células en la fase S con respecto al observado en el cultivo que permanece en presencia de la droga, ni tampoco genera una recuperación de la viabilidad celular. Al igual que ocurría en el tipo silvestre, Rad53 permanece fosforilada tras retirar el agente alquilante del medio. Todo ello sugiere que, en ausencia de Mag1, los efectos ocasionados por el MMS en la progresión de las horquillas de replicación no se revierten al eliminar dicho agente, sino que las células requieren la ruta de reparación por escisión de bases para reparar el daño causado y permitir así la continuación de la replicación.

Los resultados obtenidos con los mutantes *rad52* Δ y *rad18* Δ son similares entre sí y ligeramente distintos a los de *mag1* Δ (Fig. R6C y 6D). En ambos casos, los perfiles de citometría indican que, cuando el MMS se elimina del medio, estas células son capaces de progresar en la fase S, desplazándose hacia el pico de DNA 2C con mayor velocidad que en presencia del agente alquilante. Como muestran los inmunoblots de las Figs. R6C y R6D, Rad53 permanece fosforilada en estas condiciones y, por tanto, el avance observado mediante citometría de flujo se debe a que al menos una parte significativa de las horquillas paradas como consecuencia del daño en el DNA han sido capaces de continuar la replicación. Sin embargo, esta progresión no resulta acompañada de una recuperación de la viabilidad celular, lo que sugiere que los problemas generados en presencia de MMS durante la fase S y en ausencia de Rad52 o Rad18 no son reversibles mediante la simple eliminación de la droga.

Del mismo modo, los resultados obtenidos con el mutante *rad52* Δ *rad18* Δ (Fig. R6E) coinciden con los derivados del estudio de los mutantes simples. Como se observa por citometría de flujo, la eliminación del MMS del medio genera un desplazamiento de las células hacia el pico de DNA 2C, pero este no produce una recuperación de la viabilidad celular (Fig. R6E). Al igual que en los casos anteriores, el retraso en la migración electroforética de Rad53 indica que esta proteína permanece fosforilada y que, por tanto, el *checkpoint* se encuentra activo tras la eliminación de la droga, por lo que el avance en la progresión de las células a través de la fase S no se debe a la iniciación de la replicación desde nuevos orígenes de replicación.

En conjunto, estos resultados indican que los efectos ocasionados por el MMS durante la fase S y en ausencia de la ruta de reparación por escisión de bases, del proceso de recombinación homóloga o de las vías de tolerancia al daño, no se revierten con la simple eliminación del agente alquilante del medio.

1.6.2. Estudios de reversibilidad (II): inducción de la proteína de interés

Para estudiar en más detalle la reversibilidad de los efectos causados por el MMS en los mutantes *mag1* Δ , *rad52* Δ y *rad18* Δ , construimos cepas en las cuales el promotor del gen de interés se reemplazó por el promotor *GALI-10*. Este promotor sólo se activa en presencia de galactosa como fuente de carbono, mientras que en presencia de rafinosa la expresión del gen no se induce. Por tanto, mediante el empleo de estos

azúcares, se puede conseguir una expresión condicional de la proteína a estudio. Con este fin, se construyeron las cepas *GAL-MAG1*, *GAL-RAD52* y *GAL-RAD18*.

En todos los casos, las células se crecieron en un medio rico con rafinosa como fuente de carbono (promotor *GAL* inactivo), se sincronizaron con factor α en la fase G1 y después se liberaron del bloqueo en un medio fresco con rafinosa, en ausencia y en presencia de MMS. Transcurrida 1 h, el cultivo tratado con la droga se dividió en tres: uno de ellos permaneció en rafinosa y con MMS; en los otros dos, el MMS se eliminó del medio y las células se resuspendieron en un medio fresco, con rafinosa en el primer caso y con galactosa en el segundo (promotor *GAL* activado). La progresión en el ciclo celular se siguió mediante citometría de flujo, y se estudió tanto la viabilidad celular como el estado del *checkpoint* de la fase S. Además, la expresión de las proteínas de interés bajo el control del promotor regulable fue comprobada mediante inmunoblot, gracias a su fusión con el epítipo HA (Fig. R7).

Los resultados obtenidos en el caso de la cepa silvestre utilizada como control (Fig. R7A) fueron muy similares a los observados en un medio con glucosa como fuente de carbono (Fig. R6A). El perfil de citometría de flujo muestra que estas células progresan lentamente a través de la fase S en el medio con rafinosa y MMS (Fig. R7A) y, tras la eliminación del mismo a los 60 min, se observa un claro desplazamiento hacia el pico de DNA 2C, tanto en el medio con rafinosa como en el medio con galactosa. Además, la viabilidad celular se mantiene alta y relativamente constante a lo largo del experimento, y Rad53 permanece fosforilada tras la eliminación de la droga, en presencia de cualquiera de los dos azúcares en el medio (Fig. R7A).

En el caso de la cepa *GAL-MAG1* (Fig. R7B), las células no progresan a través de la fase S en el medio con rafinosa en presencia de MMS. Si este se elimina a los 60 min y las células se liberan en un medio fresco con rafinosa, la progresión a través de la fase S no se restablece. La expresión de Mag1 es indetectable bajo estas condiciones y las células se comportan como un mutante nulo *mag1* Δ en un medio con glucosa (Fig. R6B). Por el contrario, cuando las células se liberan del MMS en un medio con galactosa, Mag1 se expresa y entonces son capaces de reanudar su progresión en la fase S. Como Rad53 permanece hiperfosforilada incluso tras la eliminación de la droga, al igual que ocurre en el tipo silvestre, la activación de nuevos orígenes de replicación se encuentra inhibida y, por tanto, el avance observado en la fase S en la cepa *GAL-MAG1* se debe a la reanudación de la síntesis de DNA por las horquillas de replicación que previamente habían quedado bloqueadas debido al tratamiento con MMS y a la ausencia de Mag1. Es destacable que esta reanudación de la progresión de las horquillas de replicación resultó acompañada de una recuperación casi completa de la viabilidad celular (Fig. R7B). Los resultados obtenidos muestran por tanto que, aunque las células que carecen de la ruta de reparación por escisión de bases manifiestan deficiencias graves en la progresión de las horquillas de replicación cuando son tratadas con MMS, estos defectos son en gran parte reversibles.

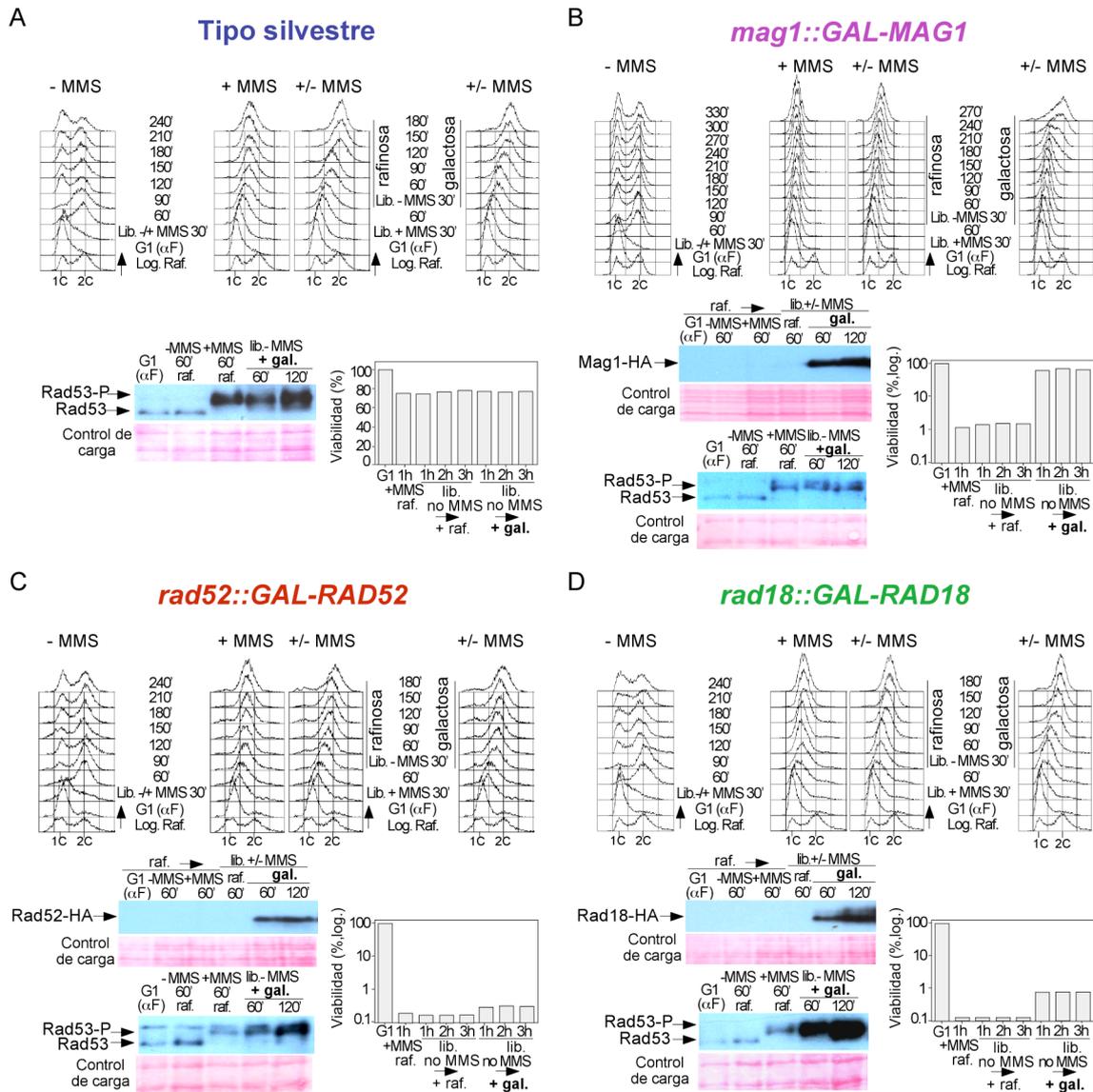


Figura R7. Estudios de reversibilidad (II). Estudio del efecto de la eliminación del MMS del medio y de la inducción de la proteína de interés en la progresión de las células en la fase S y en la viabilidad celular. Las células se crecieron en un medio con rafinosa, se sincronizaron en la fase G1 con factor α y después se liberaron del bloqueo en un medio fresco con rafinosa, tanto en ausencia como en presencia de MMS (0,033%). A los 60 min de la liberación, el cultivo con MMS se dividió en tres: uno de ellos se mantuvo en rafinosa y en presencia de la droga; en los otros dos, el MMS se eliminó del medio y las células se resuspendieron en un medio fresco, con rafinosa o galactosa, respectivamente. En el transcurso de los experimentos se tomaron muestras a los tiempos indicados en la figura para el análisis del contenido en DNA mediante citometría de flujo, para el estudio de la viabilidad celular y para la obtención de proteínas. Los inmunoblots muestran la expresión de las proteínas de fusión con el epítipo HA y el análisis de la fosforilación de Rad53. La zona de la membrana correspondiente a la migración de la proteína analizada en cada caso se muestra, teñida con Ponceau S, como control de carga. (A) tipo silvestre (cepa YJT110), (B) *mag1::GAL-3HA-MAG1* (cepa YVR16), (C) *rad52::GAL-3HA-RAD52* (cepa YVR17) y (D) *rad18::GAL-3HA-RAD18* (cepa YVR18).

La situación es diferente en las cepas *GAL-RAD52* y *GAL-RAD18* (Fig. R7C-D). Cuando estas células se crecen en un medio con rafinosa en presencia de MMS, son incapaces de avanzar de forma eficiente en la fase S, al igual que ocurre en los mutantes nulos *rad52* Δ y *rad18* Δ (Figs. R2A y R3A). En ambos casos, al retirar el MMS del medio, se observa un avance en la progresión de las células a través de la fase S, bastante similar al detectado cuando la droga se elimina y las células se liberan en un medio con galactosa, que permite la expresión de las proteínas, según muestran los

inmunoblots (Fig. R7C-D). El comportamiento de las células es prácticamente igual que el de los correspondientes mutantes nulos en un medio con glucosa (Fig. R6C-D). Rad53 permanece fosforilada tras la eliminación del MMS, por lo que el *checkpoint* continúa activo y, por tanto, como en los casos anteriores, la nueva síntesis de DNA debe tener lugar desde horquillas de replicación que estaban bloqueadas. La viabilidad de la cepa *GAL-RAD52* permanece baja, incluso tras la expresión de Rad52 en el medio (Fig. R7C). Lo mismo ocurre en la cepa *GAL-RAD18*, aunque en este caso la expresión de Rad18 tras suprimir la droga del medio consigue una pequeña recuperación de la viabilidad celular, de aproximadamente un 1% del valor inicial (Fig. R7D). Estos resultados indican que los efectos de la ausencia de la recombinación homóloga o de las vías de tolerancia al daño sobre la replicación de un DNA alquilado, a diferencia de los debidos a la ausencia de Mag1, no son reversibles o, al menos, no lo son de forma significativa.

1.7. Estudio de la acumulación de las proteínas Mag1 y Rad52 en respuesta al daño en el DNA originado por el MMS durante la fase S

Los resultados descritos anteriormente indican que las proteínas Mag1, Rad52 y Rad18 facilitan la progresión de las horquillas de replicación en presencia de lesiones en el material genético debidas al tratamiento con MMS. Por ello, nos propusimos analizar si, en presencia de daño en el DNA, estas proteínas se acumulan formando focos de reparación, desde los cuales, en caso de ser así, podrían llevar a cabo su función. Para ello, se fusionaron los genes *MAG1*, *RAD52* y *RAD18* al de la proteína fluorescente verde *-GFP-* (Longtine y col., 1998), obteniéndose de este modo proteínas de fusión cuya localización podría ser determinada mediante microscopía de fluorescencia. En el caso de Rad18, debido probablemente a los bajos niveles de expresión de esta proteína, no fue posible su detección mediante inmunoblot o microscopía, a pesar de constatar mediante PCR, al igual que en los casos de *RAD52-GFP* y *MAG1-GFP*, que la integración de la construcción en el genoma era correcta. También se intentó emplear una cepa *RAD18-GFP* donada por la Dra. Helle Ulrich (Cancer Research U.K.), pero en este caso tampoco se consiguió detectar la proteína de fusión.

Como control positivo de estos experimentos se utilizó la cepa *DDC2-GFP*. En condiciones de daño en el DNA causado por MMS, la proteína Ddc2, subunidad reguladora de Mec1, se acumula formando focos (Tercero y col., 2003). Para llevar a cabo estos ensayos, las células se crecieron en un medio mínimo suplementado y se bloquearon en la fase G1 del ciclo con factor α . Una vez sincronizados, los cultivos se liberaron del bloqueo en un medio fresco, en ausencia y en presencia de MMS, durante 1 h. Tras este tiempo, las células se observaron mediante microscopía de fluorescencia. Los resultados obtenidos se muestran en la Fig. R8.

Tal y como se describe en la literatura, en las células liberadas en la fase S en presencia de MMS detectamos acumulación de la proteína Ddc2-GFP en focos en la gran mayoría de las células (Fig. R8A). De manera similar, tanto en el caso de la cepa *MAG1-GFP* como en el de *RAD52-GFP*, podemos visualizar acumulaciones de las correspondientes proteínas de fusión en un porcentaje muy elevado de las células, que se forman cuando estas se liberan en la fase S en presencia de MMS (Fig. R8B-C). En

el caso de Rad52-GFP, también se observa un cierto número de células con algún tipo de acumulación incluso en ausencia de la droga. Estos resultados indican que, cuando el DNA se daña durante la fase S por el tratamiento con MMS, las proteínas Mag1 y Rad52 se acumulan, posiblemente formando focos de reparación.

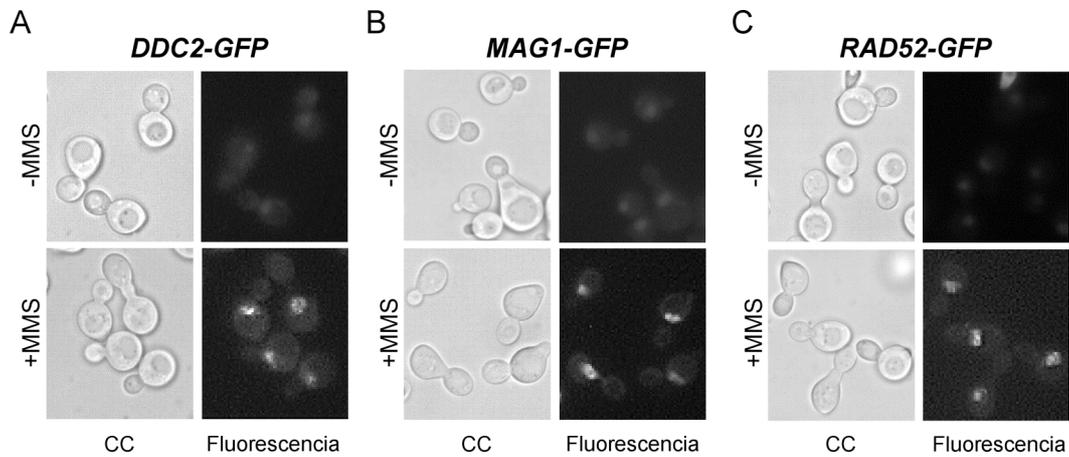


Figura R8. Análisis de la acumulación de las proteínas Mag1-GFP y Rad52-GFP en respuesta al daño en el DNA causado por MMS. Las células fueron sincronizadas en G1 y liberadas posteriormente en la fase S, durante 1 h, tanto en ausencia como en presencia de MMS (0,033%). En la figura se muestran imágenes de campo claro y de microscopía de fluorescencia, donde se detecta la acumulación de las proteínas etiquetadas con GFP. (A) *DDC2-GFP* (cepa YJT129), (B) *MAG1-GFP* (cepa YVR10) y (C) *RAD52-GFP* (cepa YVR9).

Dado el papel que ejerce el *checkpoint* de la fase S en el mantenimiento de la estabilidad de las horquillas de replicación en condiciones de daño en el DNA, quisimos analizar si las acumulaciones observadas dependían de Rad53. Para ello, construimos las cepas *MAG1-GFPrad53Δsml1Δ* y *RAD52-GFPrad53Δsml1Δ*, y llevamos a cabo el mismo tipo de experimentos, analizando la acumulación de Mag1 y de Rad52 tras 1 h de tratamiento con MMS durante la fase S. Los resultados obtenidos indican que las proteínas Mag1-GFP y Rad52-GFP se acumulan en condiciones de daño en el DNA, incluso en ausencia de Rad53 (Fig. R9A-B), por lo que es un hecho independiente de la actuación de esta quinasa.

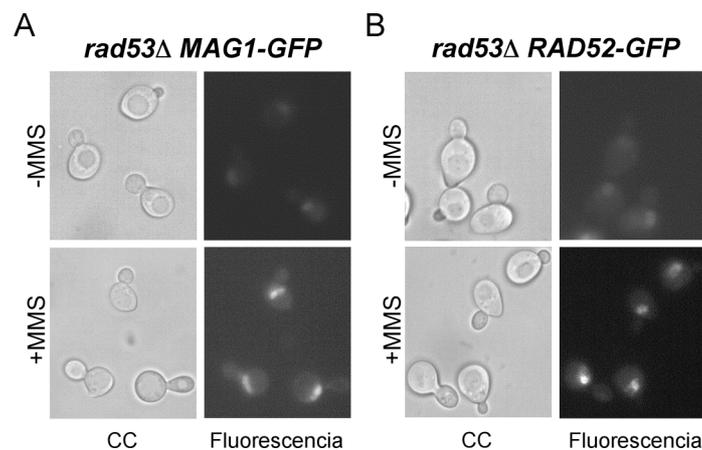


Figura R9. La acumulación de las proteínas Mag1 y Rad52 durante la fase S en presencia de MMS es independiente de Rad53. Los detalles experimentales y de la representación de los resultados son iguales a los descritos en la Figura R8. (A) *rad53Δsml1ΔMAG1-GFP* (cepa YMV2) y (B) *rad53Δsml1ΔRAD52-GFP* (cepa YMV6).

2. ESTUDIO DEL PAPEL DE LA ENDONUCLEASA Mus81-Mms4 DE *S. cerevisiae* EN LA RESPUESTA CELULAR AL DAÑO EN EL DNA DURANTE LA FASE S DEL CICLO CELULAR

En la segunda parte de esta tesis nos planteamos el estudio del papel de la nucleasa Mus81-Mms4 de *S. cerevisiae* durante la fase S del ciclo celular, en condiciones de daño en el DNA. Como se ha explicado en la Introducción, esta nucleasa está asociada a la reparación de lesiones en el material genético mediante recombinación. No obstante, si bien se han realizado numerosos estudios que han permitido identificar un buen número de sustratos de la misma *in vitro*, no se conocen con exactitud sus sustratos *in vivo*, y al principio de este trabajo la función celular de este complejo no se había estudiado en profundidad.

2.1. Mus81-Mms4 es esencial para el mantenimiento de la viabilidad celular durante la fase S del ciclo celular cuando las células son tratadas con MMS

Como se ha explicado en la Introducción, las levaduras que carecen de la endonucleasa Mus81-Mms4 son sensibles al tratamiento con diferentes agentes que originan daño en el DNA, como el MMS (Boddy y col., 2000; Interthal y Heyer, 2000; Doe y col., 2002). La mayoría de los estudios se realizaron provocando un daño crónico en el material genético, analizando cuáles eran las consecuencias para el crecimiento celular en medio sólido. En esta parte de la tesis nos propusimos estudiar el posible papel de Mus81-Mms4 en la respuesta al daño en el DNA, específicamente durante la fase S del ciclo celular. Para ello, construimos mediante sustitución génica (ver Materiales y Métodos) mutantes nulos de los genes que codifican las subunidades catalítica y reguladora del complejo, *mus81Δ* y *mms4Δ*, respectivamente, así como un doble mutante *mus81Δmms4Δ*. La obtención de estas cepas fue verificada por PCR y su viabilidad mediante el crecimiento en placa a diferentes temperaturas. Asimismo, se estimó el tiempo de generación de cada una de ellas, que fue similar al de las células de tipo silvestre utilizadas como control, lo que sugiere que Mus81-Mms4 no es necesaria para el crecimiento normal de *S. cerevisiae*, al menos en las condiciones habituales de trabajo en el laboratorio.

Para estudiar la participación de Mus81 y de Mms4 en la progresión de las células en la fase S en presencia de daño en el material genético, se crecieron los mutantes *mus81Δ*, *mms4Δ* y *mus81Δmms4Δ* -así como una cepa control del tipo silvestre- en un medio rico, se sincronizaron en la fase G1 del ciclo con factor α , y se liberaron en la fase S, tanto en ausencia como en presencia de MMS a distintas concentraciones. La progresión en el ciclo y la viabilidad celular se analizaron a partir de muestras celulares tomadas en el transcurso de los experimentos. En la Fig. R10 (A-D) se muestran los perfiles de citometría de flujo de cada una de las cepas. Por simplicidad en la exposición de los resultados, solo se representa la citometría correspondiente al tratamiento de las células con la mayor concentración de MMS utilizada, 0,033%.

En todos los casos, tras la liberación del bloqueo en G1 en un medio fresco en ausencia del agente alquilante, las células avanzan normalmente a través de la fase S,

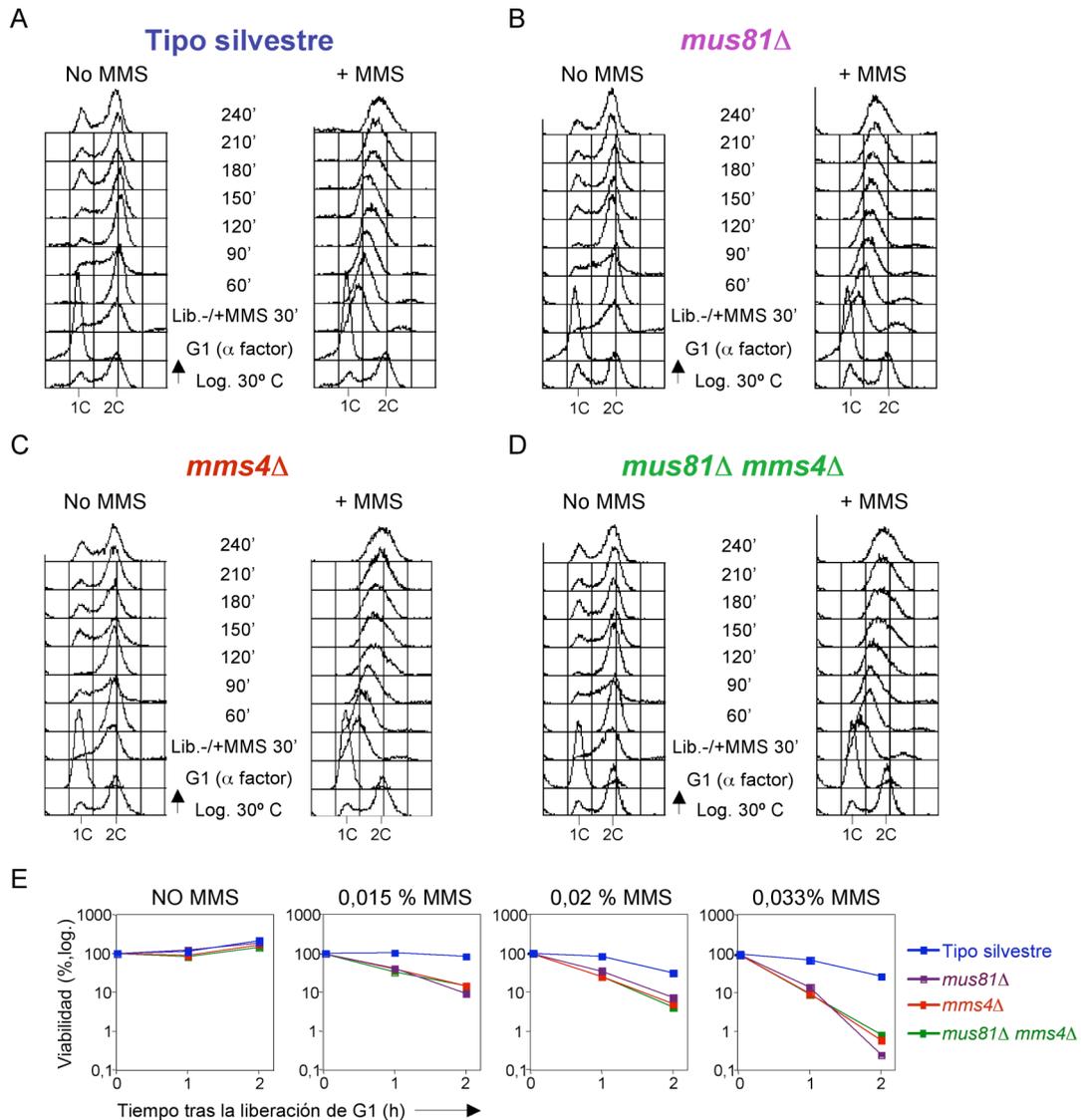


Figura R10. Progresión en la fase S y viabilidad celular de los mutantes de la endonucleasa *MUS81-MMS4* en presencia de daño en el DNA. Las células se crecieron en un medio rico, se bloquearon en la fase G1 con factor α y se liberaron en la fase S en ausencia y en presencia de MMS a distintas concentraciones (0,015%, 0,02% y 0,033%). (A-D): Determinación del contenido en DNA a lo largo del experimento mediante citometría de flujo. Se representa el resultado obtenido con la mayor concentración de MMS utilizada, 0,033%. (A) tipo silvestre (cepa W303-1a), (B) *mus81Δ* (cepa YMV39), (C) *mms4Δ* (cepa YMV48) y (D) *mus81Δmms4Δ* (cepa YMV49). (E): Viabilidad celular del tipo silvestre y de cada uno de los mutantes, en ausencia y en presencia de MMS a las diferentes concentraciones utilizadas.

finalizándola aproximadamente a los 60 min y entrando posteriormente en un nuevo ciclo celular. Por tanto, de acuerdo con la caracterización inicial de los mutantes, que no mostró diferencias de crecimiento de los mismos con respecto a las células control, ninguna de las subunidades de la endonucleasa Mus81-Mms4 es necesaria durante una fase S normal. Si las células entran en la fase S en presencia de MMS, la progresión a través de la misma se encuentra ralentizada en todos los casos, y no se observan diferencias significativas entre los perfiles de citometría de flujo del tipo silvestre y de cada uno de los mutantes. Sin embargo, tanto los mutantes simples *mus81Δ* y *mms4Δ* como el doble mutante *mus81Δmms4Δ* sufren una importante pérdida de viabilidad celular con respecto a las células control, relativamente proporcional a la cantidad de MMS utilizada y al tiempo de exposición a este compuesto (Fig. R10E). Como se puede observar, la pérdida de viabilidad que origina el tratamiento con MMS durante la fase S en ausencia de cualquiera de las subunidades del complejo Mus81-Mms4, o de ambas,

es prácticamente idéntica. Estos resultados muestran que la endonucleasa Mus81-Mms4 ejerce un papel importante en la respuesta al daño en el DNA durante la fase S, necesario para el mantenimiento de la viabilidad celular, a pesar de no observarse diferencias significativas en la progresión de las células en la fase S en su ausencia con respecto al tipo silvestre. Dado que las consecuencias de la carencia de una o de ambas subunidades de esta endonucleasa son las mismas, la mayoría de los experimentos que se describen a continuación están realizados únicamente con el mutante de la subunidad catalítica, *mus81Δ*.

2.2. El *checkpoint* de la fase S es funcional en el mutante *mus81Δ*

Para establecer con seguridad que la pérdida de viabilidad observada en las células que carecen de Mus81-Mms4 cuando son tratadas con MMS se debe a la ausencia esta endonucleasa y no a un posible defecto en el *checkpoint* de la fase S, lo que resultaría en un fenotipo similar, comprobamos que este se encontraba activo y funcional en el mutante *mus81Δ*.

En primer lugar analizamos el estado de la fosforilación y la actividad quinasa de Rad53. Para ello, las células *mus81Δ* se crecieron en un medio rico, se sincronizaron en la fase G1 y se liberaron en la fase S en ausencia y en presencia de MMS, durante 4 h. En el transcurso del experimento se tomaron muestras celulares para la extracción de proteínas y su posterior análisis mediante inmunoblot. Como se puede observar en la Fig. R11A, Rad53 solo se encuentra hiperfosforilada, y por tanto activada, cuando las células *mus81Δ* se liberan en la fase S en presencia de MMS. Para corroborar que la fosforilación de la proteína observada se correlaciona con su activación, llevamos a cabo un ensayo de actividad quinasa *in situ* (Pellicoli y col., 1999) según el protocolo detallado en Materiales y Métodos, empleando las mismas muestras proteicas analizadas en el inmunoblot descrito anteriormente (Fig. R11B). El resultado obtenido confirma que la fosforilación de Rad53 se corresponde con la adquisición de su propia actividad quinasa, ya que solo detectamos autofosforilación de esta proteína cuando las células se encuentran en la fase S y son expuestas al MMS.

En segundo lugar, para confirmar que el *checkpoint* es funcional en el mutante *mus81Δ*, examinamos la elongación del huso mitótico en células tratadas con MMS durante la fase S. Para ello, se fusionó el gen de la tubulina (*TUB1*) al de la proteína fluorescente verde (*GFP*) en el mutante nulo *mus81Δ*. Las cepas *sml1ΔTUB1-GFP* y *rad53Δsml1ΔTUB1-GFP* se emplearon, respectivamente, como control de un tipo silvestre y de una cepa con un *checkpoint* defectivo. Las células se bloquearon en la fase G1 con factor α y se liberaron en la fase S en presencia de MMS durante 2 h. Las imágenes de microscopía de fluorescencia (Fig. R11C) muestran que, al igual que ocurre en las células del tipo silvestre y, a diferencia de lo observado en el mutante del *checkpoint* *rad53Δ*, que no puede prevenir la mitosis, la elongación del huso mitótico se encuentra inhibida en la cepa *mus81ΔTUB1-GFP* tras el tratamiento con el agente alquilante, lo que indica que el *checkpoint* de la fase S está activo en esta última.

Los experimentos realizados permiten concluir por tanto que el *checkpoint* de la fase S está activo y es funcional en ausencia de la endonucleasa Mus81-Mms4. Es decir,

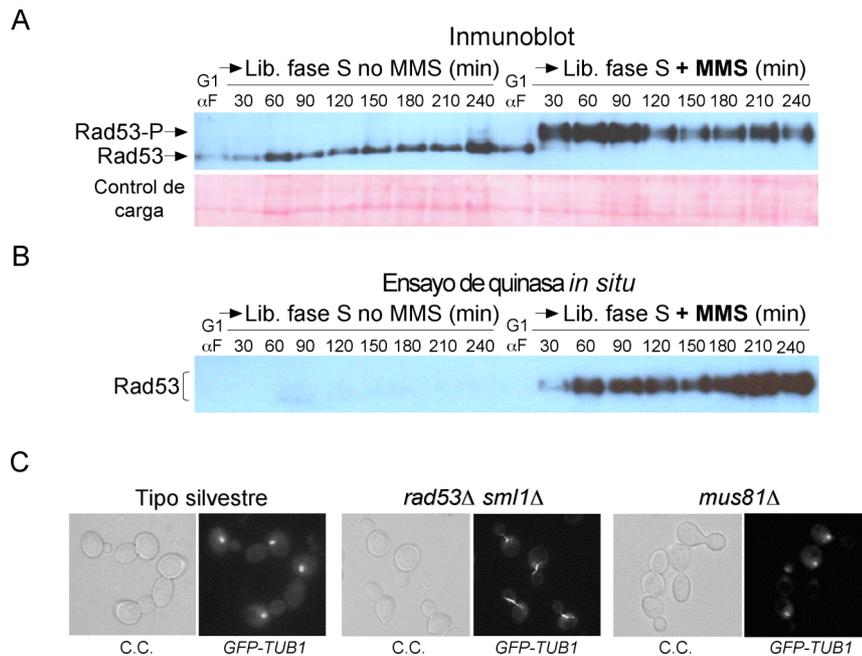


Figura R11. Actividad del checkpoint de la fase S en el mutante *mus81Δ* en condiciones de daño en el DNA. (A): Inmunoblot de Rad53. Se identificaron las formas no fosforilada (Rad53) y fosforilada (Rad53-P) de esta proteína. Como control de carga se muestra la zona de la membrana correspondiente a la migración de Rad53, teñida con Ponceau S. (B): Ensayos de actividad quinasa *in situ* para Rad53. La autofosforilación de esta proteína se midió mediante la incorporación de γ -ATP marcado radioactivamente. Las muestras proteicas se corresponden con las analizadas mediante inmunoblot. (C): Estudio de la elongación del huso mitótico mediante microscopía de fluorescencia. Las células se bloquearon en la fase G1 y se liberaron en la fase S en presencia de MMS (0,033%) durante 2 h. Las imágenes muestran el estado del huso mitótico en las células del tipo silvestre *TUB1-GFP* (cepa YJT126), *rad53Δsml1ΔTUB1-GFP* (cepa YJT127) y *mus81ΔTUB1-GFP* (cepa YMV22).

la pérdida de viabilidad observada en el mutante *mus81Δ* en condiciones de daño en el DNA se debe a los problemas originados por la falta de esta endonucleasa y no a posibles defectos en la actuación del *checkpoint*. Asimismo, estos resultados indican que la acción de Mus81-Mms4 no se requiere para generar la señal que activa el *checkpoint* de la fase S cuando existen lesiones en el DNA.

2.3. La formación de las horquillas de replicación y la iniciación de la replicación del DNA en presencia de daño en el material genético es aparentemente normal en el mutante *mus81Δ*

Los experimentos anteriores han mostrado que Mus81-Mms4 es importante para hacer frente al daño en el DNA durante la fase S del ciclo celular. Según la citometría de flujo (Fig. R10A-D), la fase S es aparentemente normal en los mutantes de la nucleasa con respecto al tipo silvestre cuando las células son tratadas con MMS, pero sufren una importante pérdida de viabilidad (Fig. R10E). La citometría de flujo muestra que las células progresan en la fase S y sugiere que podrían haber terminado la replicación cromosómica, pero se necesitan ensayos más precisos para determinar el estado de la replicación del DNA y la calidad de la misma, que podrían explicar la pérdida de viabilidad celular tras la exposición al MMS. Por ello, analizamos en primer lugar la formación y el estado de las horquillas, así como la iniciación de la replicación del DNA, mediante electroforesis en geles bidimensionales de agarosa.

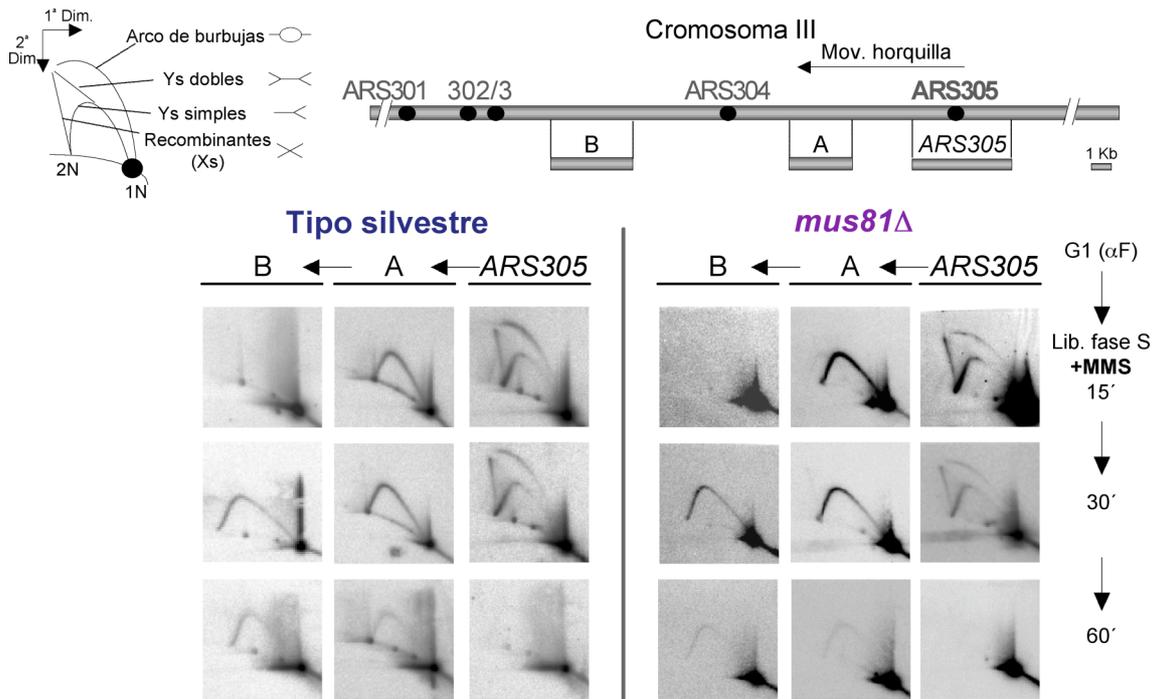


Figura R12. Análisis de la replicación en condiciones de daño en el DNA en el mutante *mus81Δ* mediante gels bidimensionales. Las células silvestres (cepa YJT110) y las mutantes *mus81Δ* (cepa YMV17) se crecieron en un medio rico, se sincronizaron con factor α y se liberaron en la fase S en presencia de 0,033% de MMS. A los 15, 30 y 60 min tras la liberación de las células en presencia del agente alquilante, se tomaron muestras celulares para la extracción de DNA genómico y su posterior digestión y análisis mediante electroforesis en gels bidimensionales. A continuación, mediante la hibridación con sondas específicas, se estudió el establecimiento y la progresión de las horquillas de replicación en un replicón del cromosoma III, desde el origen temprano *ARS305* hacia las regiones adyacentes (fragmentos A y B). La posición relativa de cada uno de los fragmentos con respecto al *ARS305* se indica en la parte superior de la figura, así como el sentido del movimiento de las horquillas de replicación, desde dicho origen, a lo largo del replicón del cromosoma III analizado. En la parte superior izquierda de la figura se representa un esquema de las estructuras que se pueden detectar de forma habitual en la horquillas de replicación mediante la técnica empleada.

Para realizar estos estudios, se sincronizaron en la fase G1 células mutantes *mus81Δ* y un control del tipo silvestre, y se liberaron en la fase S en presencia de MMS. A lo largo del experimento se tomaron muestras para la extracción de DNA genómico y su posterior digestión con enzimas específicas, que fueron procesadas según lo descrito en el apartado 10.2 de Materiales y Métodos. La formación de las horquillas y el estado de los intermediarios de replicación se analizaron en el origen temprano *ARS305*, y se estudió el desplazamiento de las horquillas de replicación hacia las regiones adyacentes del cromosoma III.

Como se puede observar en la Fig. R12, a los 15 min de la liberación de las células en la fase S en presencia de MMS no existen diferencias significativas entre las estructuras detectadas en el origen *ARS305* en las células silvestres y en las células *mus81Δ*. Así, tanto las intensidades del arco de burbuja como las del arco simple Y y las de los intermediarios X de recombinación son similares en ambas cepas. Todo ello indica que este origen se activa en el mutante *mus81Δ*, que las horquillas de replicación se establecen de forma aparentemente normal en el mismo, y que la iniciación de la replicación no está afectada en ausencia de la endonucleasa a pesar de la exposición al MMS. Además, en este punto del experimento, la presencia en ambas cepas del arco de

replicación pasivo (arco Y) en el fragmento adyacente A, indica que una parte de las horquillas de replicación han invadido ya esa zona y que, por tanto, al menos un porcentaje alto de las horquillas formadas son funcionales y pueden desplazarse. Tras 30 min en presencia del agente alquilante, el arco pasivo se detecta también en el fragmento B, mostrando que hay horquillas que siguen progresando. A los 60 min, no se detectan intermediarios de replicación en el fragmento correspondiente al origen *ARS305* en ninguna de las cepas y solo una señal débil del arco pasivo en los fragmentos A y B, lo que sugiere que las zonas del cromosoma III analizadas han sido replicadas. Como se ha mencionado en la Introducción, se ha propuesto que Mus81-Mms4 podría estar implicada tanto en la rotura de horquillas de replicación bloqueadas por lesiones en el DNA para iniciar la recombinación como en el procesamiento de intermediarios que resulten de la reparación de horquillas dañadas. Como se observa en la Fig. R12, en los experimentos realizados no se ha detectado ninguna acumulación de intermediarios de replicación o recombinación, ni la aparición en el mutante *mus81Δ* de estructuras diferentes a las encontradas en el tipo silvestre.

2.4. La progresión de las horquillas de replicación en condiciones de daño en el DNA está afectada en ausencia de Mus81

A continuación seguimos estudiando con otro abordaje experimental si la replicación cromosómica está afectada en células tratadas con MMS que carecen de la nucleasa Mus81-Mms4. Si bien los experimentos anteriores han mostrado que las horquillas de replicación se forman normalmente en el mutante *mus81Δ* y que la iniciación de la replicación es similar a la del tipo silvestre, es difícil utilizar este método de forma cuantitativa, y no resulta posible estimar con precisión el porcentaje de horquillas que progresan a lo largo de un replicón en un experimento, ni la cantidad de DNA replicado. Por ello, estudiamos el desplazamiento de las horquillas de replicación en las condiciones de daño en el DNA que venimos analizando empleando el método de sustitución de isótopos de densidad, que sí permite calcular el porcentaje de DNA replicado en cada momento y correlacionarlo con el número de horquillas que progresan y la estabilidad y funcionalidad de las mismas.

Estos experimentos se llevaron a cabo en paralelo con células control del tipo silvestre y con el mutante de delección *mus81Δ*, mediante la técnica de sustitución de isótopos de densidad, del mismo modo a lo descrito en el apartado 1.1, y en el mismo replicón del cromosoma VI, desde el origen *ARS607* hasta el final del cromosoma. Las células se crecieron en un medio con isótopos pesados, se sincronizaron en la fase G1 con factor α y se transfirieron a un medio con isótopos ligeros, tras lo que fueron liberadas en la fase S, en ausencia y en presencia de MMS. Al comienzo del experimento, en células sincronizadas en la fase G1 (Fig. R13A-C, fila superior), todos los fragmentos de DNA analizados se encuentran en el pico HH (pesado-pesado), correspondiente al DNA no replicado. Cuando las células se liberan en la fase S en un medio con isótopos ligeros y en ausencia de MMS, todos los fragmentos se replican y muestran un pico de DNA pesado-ligero (HL, replicado), tanto en las del tipo silvestre como en las del mutante *mus81Δ* (Fig. R13A-C, fila inferior). Esto está de acuerdo con el hecho de que la fase S es normal en ausencia de daño en el DNA en las células que carecen de Mus81-Mms4.

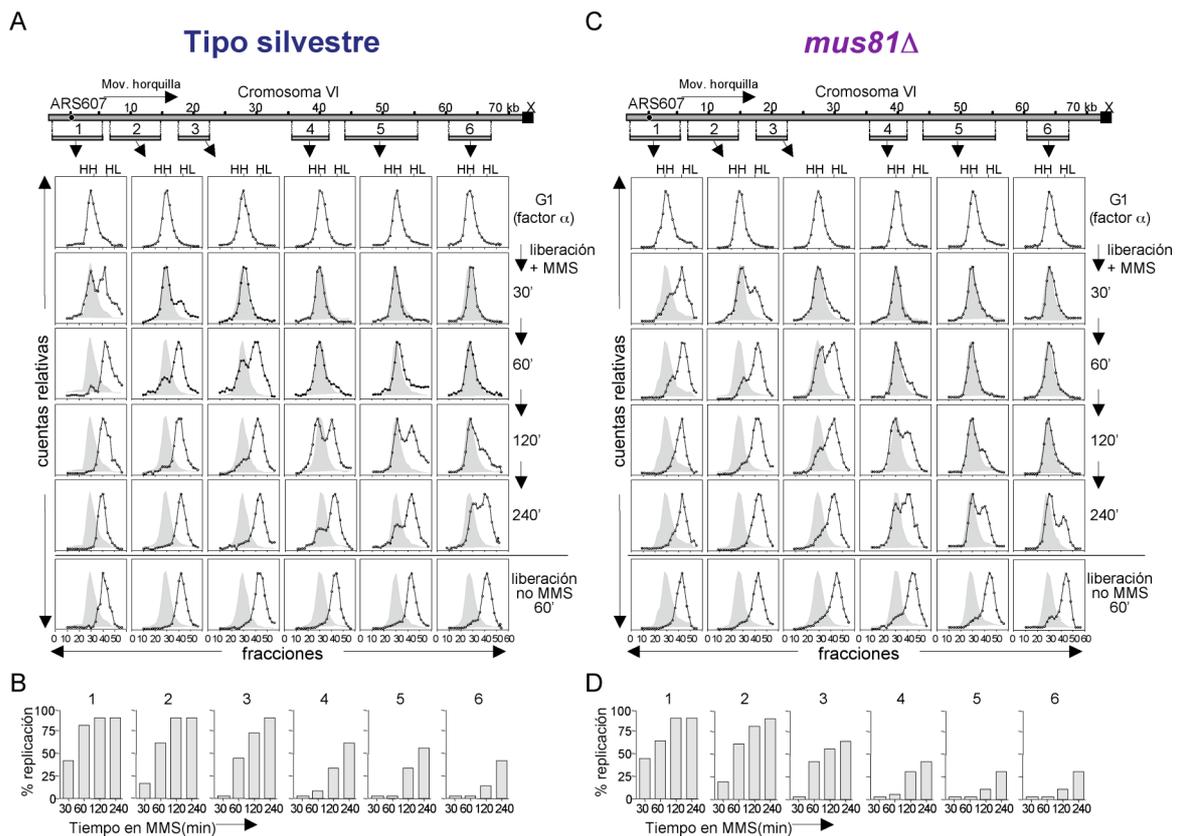


Figura R13. Análisis de la progresión de las horquillas de replicación a través de un DNA dañado por MMS en el mutante *mus81Δ* mediante sustitución de isótopos de densidad. Las células se bloquearon en la fase G1 con factor α en un medio mínimo con isótopos pesados y se liberaron del bloqueo en un medio con isótopos ligeros, en ausencia y en presencia de MMS (0,033%). (A, C): Análisis de la progresión de las horquillas de replicación mediante sustitución de isótopos de densidad, en un replicón del cromosoma VI. Los detalles son iguales a los descritos en la Figura R1. (A) tipo silvestre (cepa YJT110) y (C) *mus81Δ* (cepa YMV17). (B, D): Cuantificación del porcentaje de replicación en presencia de MMS de cada fragmento de restricción y en cada uno de los puntos del experimento indicados. (B) tipo silvestre y (D) *mus81Δ*.

Cuando las células de la cepa utilizada como control en el experimento se liberan en la fase S en presencia de MMS, los datos que se obtienen son prácticamente idénticos a los publicados previamente (Tercero y Diffley, 2001) y a los descritos en detalle para las células del tipo silvestre en el apartado 1.1 de Resultados. A los 30 min en la fase S en presencia de MMS se observan picos de DNA HL, replicado, en los fragmentos 1 y 2, lo que indica que la replicación se ha iniciado desde el origen *ARS607*. Al igual que en la Fig. R1E, las horquillas de replicación avanzan de izquierda a derecha del replicón a lo largo del experimento, de forma lenta pero eficiente. Así, a los 240 min tras la liberación de las células en la fase S en presencia del agente alquilante, la mayor parte de los fragmentos de restricción presentan un pico de DNA completamente replicado, HL (Fig. R13A, fila 5; Fig. R13B). Los cálculos realizados indican que la velocidad de las horquillas de replicación en las células silvestres tratadas con MMS es de aproximadamente 263 pb/min (calculado según lo explicado en Materiales y Métodos), valor prácticamente idéntico al estimado en los experimentos descritos en el apartado 1.1 (Fig. R1E).

En las células mutantes *mus81Δ* (Fig. R13C-D), se detecta un alto porcentaje de DNA pesado-ligero (HL) en el fragmento 1 a los 30 min en la fase S en presencia de

MMS, lo que indica que el origen *ARS607* se activa en ausencia de Mus81 y que la replicación comienza sin problemas aparentes con respecto a la cepa silvestre en estas condiciones, de acuerdo con los experimentos mostrados en el apartado anterior. En el transcurso del experimento se observa sin embargo que, si bien las horquillas de replicación avanzan a lo largo del replicón estudiado, sufren un retraso muy significativo con respecto a las células silvestres. Así, a los 60 min ya se detecta una demora en la replicación del fragmento 1 con respecto al tipo silvestre, como refleja el mayor porcentaje de DNA HL en este último. A los 120 min, a pesar de que la replicación avanza en las células *mus81Δ*, el porcentaje de DNA HL detectado en los fragmentos 2 al 6 es significativamente menor que en las células silvestres. Por ejemplo, en este punto, el DNA replicado en los fragmentos 5 y 6 en las células *mus81Δ* es tres veces menor que en el tipo silvestre. Al final del experimento, a los 240 min en la fase S en presencia de MMS, el mutante *mus81Δ* solo replica un 43, 30 y 20% de los fragmentos 4, 5 y 6, respectivamente (Fig. R13D), mostrando un defecto importante en la replicación del cromosoma analizado con respecto al tipo silvestre. Estos experimentos inciden por tanto en el hecho de que la endonucleasa Mus81-Mms4 es necesaria para hacer frente al daño en el DNA durante la replicación cromosómica y muestran que su ausencia provoca que la progresión de las horquillas de replicación en estas condiciones sea defectiva.

2.5. Mus81-Mms4 es necesaria para completar la replicación cromosómica cuando el DNA está dañado

Los experimentos de sustitución de isótopos de densidad descritos en el apartado anterior indican que la replicación del DNA es defectiva en el mutante *mus81Δ* cuando las células se exponen al MMS, debido a los problemas de las horquillas de replicación para progresar. Estos ensayos se llevaron a cabo en el cromosoma VI, y quisimos obtener una visión más global de la replicación en las mismas condiciones de daño en el DNA, en el conjunto del genoma. Para ello, analizamos la dinámica de la replicación cromosómica empleando la técnica de electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE), tras tratar con MMS a células del tipo silvestre y a mutantes *mus81Δ*. En este tipo de electroforesis, a través de la aplicación de sucesivos cambios en el campo eléctrico, los cromosomas lineales se resuelven en el gel y dan lugar a bandas discretas que migran según su tamaño. Sin embargo, los cromosomas que están siendo replicados y que, por tanto, contienen burbujas de replicación, no entran en el gel y quedan atrapados en los pocillos del mismo.

En los experimentos que llevamos a cabo, las células del tipo silvestre y las mutantes *mus81Δ* se sincronizaron en la fase G1 con factor α y se liberaron posteriormente en la fase S en presencia de MMS durante 1 h. A continuación, las células se lavaron para eliminar el MMS y se permitió su recuperación en ausencia de la droga durante 4 h en un medio fresco al que se añadió nocodazol -compuesto inhibidor de la formación de los microtúbulos- para bloquear las células en la fase G2/M e impedir su posible entrada en un nuevo ciclo celular. En el transcurso del experimento se tomaron muestras para el análisis mediante citometría de flujo y para la extracción de DNA genómico, que fueron procesadas para la electroforesis en gel de campo pulsado según lo explicado en Materiales y Métodos.

Los perfiles de citometría de flujo obtenidos en este experimento (Fig. R14A) indican que las células *mus81Δ* entran en la fase S tras su liberación del bloqueo en G1 y avanzan lentamente, y progresan más rápido tras la eliminación del MMS del medio, no mostrando diferencias significativas con respecto al avance observado en las células del tipo silvestre.

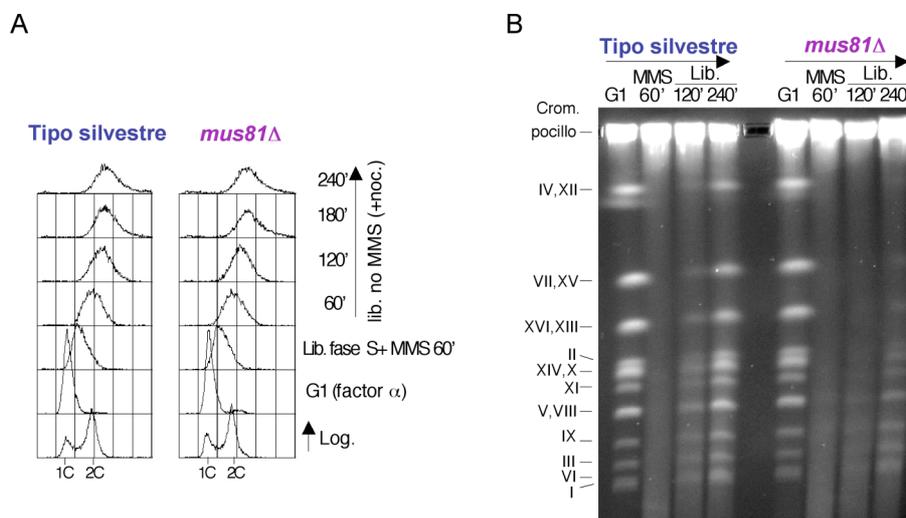


Figura R14. Análisis de la replicación cromosómica en condiciones de daño en el DNA en el mutante *mus81Δ* mediante electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE). Las células silvestres (cepa W303-1a) y las células *mus81Δ* (cepa YMV39) se crecieron en un medio rico, se bloquearon en la fase G1 con factor α , y se liberaron en la fase S en presencia de 0,033% MMS y nocodazol (5 $\mu\text{g/ml}$). Tras 1 h de actuación del agente alquilante, el MMS se eliminó del medio y las células se liberaron en un medio fresco durante 4 h. A lo largo del experimento se tomaron muestras celulares para la extracción de DNA genómico y su posterior análisis mediante electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE). (A) La progresión de ambas cepas en el ciclo celular se siguió a lo largo del experimento mediante análisis del contenido de DNA por citometría de flujo. (B) La figura muestra las imágenes de los resultados obtenidos en la electroforesis, tras la tinción de los geles con bromuro de etidio y su posterior desteñido. La posición en el gel del pocillo y de cada uno de los cromosomas de *S. cerevisiae* (marcados con números romanos), se indica a la izquierda de la figura.

Las imágenes de los geles sometidos a electroforesis de campo pulsado (Fig. R14B) muestran que, de acuerdo a lo esperado, tanto en el mutante *mus81Δ* como en la cepa control, los cromosomas de las células bloqueadas en la fase G1 del ciclo están intactos y se separan a lo largo del gel como bandas discretas. Por el contrario, tras 1 h de exposición al MMS durante la fase S, la mayor parte del DNA cromosómico queda retenido en los pocillos del gel, tanto en las células mutantes como en las silvestres, lo que indica que la replicación está en curso, de acuerdo con la citometría de flujo (Fig. R14A). Además, en ambas cepas se observa una mancha difusa en los carriles que se corresponden a este punto del experimento, consecuencia muy probablemente de la fragmentación del DNA alquilado debida a la labilidad del mismo al ser tratado con calor durante el procesamiento de las muestras (Lundin y col., 2005). En la cepa control, a las 2 h tras la eliminación del MMS del medio, el DNA cromosómico vuelve a entrar en el gel, y comienzan a detectarse de nuevo los cromosomas en forma de bandas claras y discretas a lo largo del carril. A las 4 h de recuperación en ausencia de la droga, la señal aumenta en cada una de estas bandas y el patrón de cromosomas adquiere un aspecto similar al observado durante el bloqueo de las células en G1. Por el contrario, en el mutante *mus81Δ*, a las 2 h de la retirada del MMS del medio, la mayor

parte del DNA cromosómico permanece en el pocillo, la señal de DNA degradado o fragmentado es aún mayoritaria y la presencia de las bandas correspondientes a los cromosomas se intuye solo levemente. A las 4 h de recuperación de estas células tras el tratamiento con MMS, la intensidad de dichas bandas es algo mayor, pero muy inferior a la de las células control, lo que indica que gran parte del DNA cromosómico no ha completado aún la replicación.

La cuantificación (ver Materiales y Métodos) de las señales detectadas en las bandas correspondientes a las parejas de cromosomas VII-XV y XVI-XIII, realizada en varios geles, indicó que, como media, aproximadamente el 75% de las células del tipo silvestre restablecen la replicación completa de estos cromosomas a las 4 h de la eliminación del MMS. Sin embargo, a este mismo tiempo, en ausencia de Mus81-Mms4, la recuperación es tan solo del 15%.

Estos resultados muestran por tanto que, en presencia de daño en el material genético, Mus81 es esencial para que las células puedan completar la replicación de los cromosomas, de acuerdo con los datos obtenidos en el apartado anterior, que indicaron que la progresión de las horquillas de replicación en las mismas condiciones en un replicón individual estaba afectada en ausencia de esta nucleasa.

2.6. Los efectos ocasionados por el MMS durante la fase S en ausencia de Mus81-Mms4 son en gran medida reversibles, y la nucleasa puede actuar después de que la mayor parte de la replicación cromosómica se complete

Los experimentos presentados hasta ahora han mostrado que, en ausencia de la nucleasa Mus81-Mms4, las células sufren una importante pérdida de viabilidad durante la fase S cuando son tratadas con MMS, probablemente como consecuencia de que la replicación cromosómica está afectada. Para profundizar en las implicaciones de estos resultados, nos planteamos analizar si esta situación es reversible mediante la expresión del complejo tras un tiempo de exposición al MMS. Para ello construimos una cepa en la que los promotores de los genes *MUS81* y *MMS4* se sustituyeron por el promotor *GALI-10*. Este promotor sólo se activa en presencia de galactosa en el medio como fuente de carbono, y está reprimido cuando se utiliza glucosa. La utilización de rafinosa, que no induce la expresión del gen a estudio desde el promotor, tampoco reprime el mismo, y facilita una buena inducción cuando se añade galactosa. Por tanto, mediante la utilización de estos azúcares y del promotor *GALI-10* se puede obtener una expresión condicional de las proteínas de interés, Mus81 y Mms4.

En primer lugar comprobamos el buen funcionamiento de la cepa construida (*GAL-MUS81 GAL-MMS4*) mediante el crecimiento de las células en placa, a partir de diluciones seriadas de cultivos creciendo exponencialmente (Fig. R15A). Se utilizaron como controles el tipo silvestre, un mutante *mus81Δ mms4Δ* y una cepa en la que los genes *MUS81* y *MMS4* se expresan como proteínas de fusión con el epítipo HA en el extremo N-terminal. Esta última cepa se utilizó para comprobar que el etiquetado de las proteínas, que permite su seguimiento mediante inmunoblot, no tiene un efecto sobre el crecimiento ni sobre la sensibilidad al MMS.

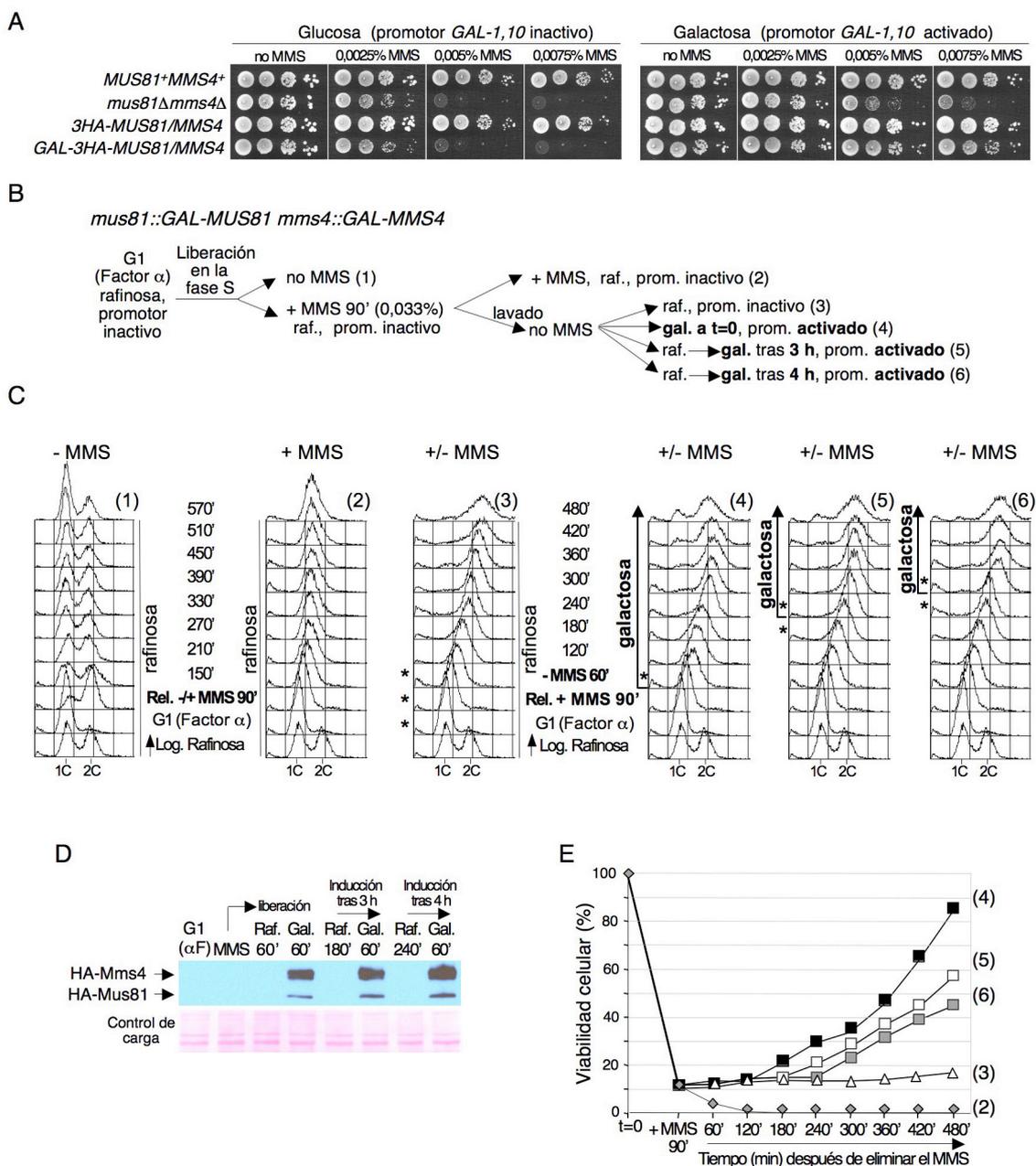


Figura R15. Reversibilidad de los efectos originados por el MMS durante la fase S en ausencia de Mus81-Mms4. (A): Determinación de la sensibilidad a distintas concentraciones de MMS mediante ensayos de crecimiento en placa, a partir de diluciones seriadas (1:10) de cultivos creciendo exponencialmente. Las células se crecieron en medio YP con glucosa o galactosa, según se indica. Las cepas son W303-1a (*MUS81+MMS4+*), YMV49 (*mus81Δmms4Δ*), YSG24 (*3HA-MUS81 3HA-MMS4*), YSG23 (*GAL-3HA-MUS81 GAL-3HA-MMS4*). (B): Esquema del experimento realizado, según lo descrito en el texto. Se utilizó la cepa YSG23 (*GAL-3HA-MUS81 GAL-3HA-MMS4*). En el transcurso del experimento se tomaron muestras para el análisis del contenido en DNA por citometría de flujo, para el estudio de la viabilidad celular y para la obtención de proteínas. (C): Determinación del contenido de DNA a lo largo del experimento mediante citometría de flujo. Los números de los paneles se corresponden con los del esquema presentado en (B). Los asteriscos indican los tiempos a los que se tomaron muestras para la extracción de proteínas. (D): Inmunoblot mostrando la expresión de las proteínas Mus81 y Mms4, detectadas gracias a su fusión con el epítipo HA. Las muestras del inmunoblot se corresponden con los tiempos señalados con asteriscos en los paneles de citometría de flujo. La zona de la membrana correspondiente a la migración de las proteínas analizada se muestra, teñida con Ponceau S, como control de carga. (E): Viabilidad celular a lo largo del experimento. Los números entre paréntesis al lado de cada una de las líneas de la gráfica se corresponden con los números de los paneles de la citometría de flujo.

Como se observa en la figura R15A, las cuatro cepas crecen de forma similar en ausencia de MMS en el medio, tanto si se emplea glucosa como si se utiliza galactosa como fuente de carbono. Esto quiere decir que ni la expresión del complejo en presencia de galactosa bajo el promotor *GALI-10*, ni la etiqueta utilizada para detectar las proteínas, tienen un efecto negativo aparente sobre el crecimiento de las células. Además, en presencia de MMS en el medio, la cepa *3HA-MUS81 3HA-MMS4* se comporta como el tipo silvestre. Cuando las células se crecen en presencia de concentraciones crecientes de MMS, con glucosa en el medio (promotor *GALI-10* reprimido), las células *GAL-MUS81 GAL-MMS4* muestran una sensibilidad similar a la del doble mutante *mus81Δ mms4Δ*, y por lo tanto se comportan como un mutante nulo. Por el contrario, cuando las células se crecen en presencia de diferentes concentraciones de MMS con galactosa en el medio (promotor *GALI-10* activado), las células *GAL-MUS81 GAL-MMS4* muestran una resistencia al MMS mucho mayor que las células *mus81Δ mms4Δ*, casi al nivel del tipo silvestre, lo que indica que la co-expresión de Mus81 y Mms4 en la misma cepa bajo un promotor inducible permite en gran medida la obtención de un complejo Mus81-Mms4 funcional.

Para analizar la posible reversibilidad del fenotipo de sensibilidad al MMS mostrado por las células deficientes en Mus81-Mms4 durante una única fase S, las células *GAL-MUS81 GAL-MMS4* se crecieron en un medio rico con rafinosa como fuente de carbono (promotor *GALI-10* inactivo), se sincronizaron en la fase G1 con factor α , y se liberaron posteriormente del bloqueo en un medio fresco con rafinosa, en ausencia y en presencia de MMS. Transcurridos 90 min, el cultivo con MMS se dividió en tres: el primero permaneció en un medio con rafinosa y MMS; en los otros dos, el MMS se eliminó del medio y las células se transfirieron a un medio fresco, con rafinosa en un caso y con galactosa en el otro (promotor *GALI-10* activado). A su vez, una parte del cultivo en el que se eliminó el MMS y se mantuvo con rafinosa se transfirió 3 h más tarde a un medio con galactosa, y otra parte del mismo se trató de igual manera tras 4 h. El esquema del experimento se dibuja en la figura R15B. La progresión en el ciclo celular se siguió mediante citometría de flujo (Fig R15C). La expresión de Mus81 y Mms4 bajo el control del promotor regulable fue comprobada mediante inmunoblot, gracias a su fusión con el epítipo HA (Fig. R15D). La viabilidad celular a lo largo del experimento se siguió por recuento de unidades formadoras de colonia en placa (Fig. R15E).

Los resultados obtenidos por citometría de flujo (Fig. R15C) indicaron que las células *GAL-MUS81 GAL-MMS4* liberadas del bloqueo en G1 en un medio con rafinosa progresan normalmente en el ciclo celular en ausencia de MMS (panel 1) y lo hacen de forma muy lenta cuando son tratadas con MMS (panel 2), lo que va acompañado en este caso de una gran pérdida de viabilidad celular (Fig. R15E). Las células se comportan por tanto de forma similar a un doble mutante *mus81Δ mms4Δ* en un medio con glucosa (Fig. R10C), siendo incluso la progresión en la fase S peor que en esta cepa, probablemente por tratarse de un medio con rafinosa, una fuente de carbono más pobre que la glucosa.

Tras 90 min en el medio con rafinosa en presencia de MMS, en el que las proteínas Mus81 y Mms4 son indetectables por inmunoblot (Fig. R15D), las células

tienen una viabilidad muy reducida. Si tras ese tiempo el MMS se elimina del medio y las células se liberan en un medio fresco con rafinosa (panel 3), estas progresan más rápidamente en la fase S, observándose un desplazamiento hacia el pico de contenido de DNA 2C. Sin embargo, a pesar de la evidente síntesis de DNA producida, las células no recuperan viabilidad, e incluso 8 h tras la liberación en un medio sin MMS, no se observan células completando el ciclo celular. Si tras eliminar el MMS las células se transfieren a un medio con galactosa (panel 4), tanto Mus81 como Mms4 se inducen, según muestra el inmunoblot (Fig. R15D). Como indica la gráfica de la Fig. R15E, a lo largo del experimento en el medio con galactosa las células llevan a cabo una recuperación muy significativa de la viabilidad. La citometría de flujo muestra además que un porcentaje considerable de las mismas finalizan el ciclo celular y aparecen con contenido de DNA 1C, encontrándose por tanto en G1, lo que indica que han completado la replicación cromosómica satisfactoriamente y han progresado a través de la mitosis. El análisis de los datos de viabilidad celular revela a su vez que la recuperación no se produce de forma inmediata tras la expresión del complejo Mus81-Mms4. A pesar de que tras 1 h de inducción ambas subunidades se detectan claramente en el medio con galactosa, el inicio de la recuperación de la viabilidad no se observa hasta las 3-4 h tras la eliminación del MMS. Esto coincide aproximadamente con los tiempos en los que las células llegan al final de la fase S, cuando la replicación de la mayor parte del genoma ha tenido lugar. Esto quiere decir que la presencia de las subunidades del complejo no es suficiente para recuperar la viabilidad, y sugiere que el momento en el que este actúe es importante.

Si las conclusiones derivadas de las observaciones anteriores eran ciertas, razonamos que si inducíamos la expresión del complejo cuando las células estuvieran próximas al contenido de DNA 2C, en lugar de en el momento de eliminar el MMS del medio, se conseguiría también una recuperación de la viabilidad celular, en este caso inmediata. Para ello, 3 h y 4 h después de la eliminación del MMS del medio, una parte del cultivo que estaba creciendo en el medio con rafinosa se transfirió a un medio con galactosa (Fig. R15C, paneles 5 y 6, respectivamente). Como se observa en el inmunoblot (Fig. R15D), el complejo se indujo de forma satisfactoria en ambos casos, obteniéndose tras 1 h niveles de Mus81 y Mms4 similares a los encontrados en la inducción de las células del panel 4. La citometría de flujo muestra que, al menos en el caso de la inducción tras 3 h en medio con rafinosa, un número significativo de células completan el ciclo celular, se dividen y pasan a la fase G1. Tanto si la inducción se produce a las 3 h como si tiene lugar a las 4 h, la viabilidad celular se recupera de forma considerable. Además, esta recuperación, progresiva, empieza a producirse inmediatamente tras la inducción de las proteínas, a diferencia de lo encontrado en el caso anterior, probablemente porque las células ya están al final de la fase S.

Estos experimentos muestran por tanto que los efectos que el MMS produce sobre la viabilidad celular durante la fase S en ausencia de la nucleasa Mus81-Mms4 son en gran parte reversibles tras la inducción de ambas subunidades del complejo. Los resultados indican también que la recuperación de la viabilidad solo se inicia cuando las células llegan al final de la fase S, lo que sugiere que Mus81-Mms4 actúa una vez que la mayor parte de la replicación cromosómica ha tenido lugar.

2.7. Mus81-Mms4 no es necesaria para hacer frente al estrés replicativo provocado por el tratamiento con hidroximetilurea en *S. cerevisiae*

Los experimentos descritos anteriormente han mostrado que Mus81-Mms4 tiene un papel importante en la respuesta celular al daño en el DNA durante la fase S. A continuación, nos preguntamos si esta nucleasa es también necesaria para hacer frente al estrés replicativo en *S. cerevisiae*. Para ello, las células se trataron con hidroximetilurea (HU), un inhibidor de la ribonucleótido reductasa que provoca una disminución en la concentración de dNTPs de la célula. La consecuencia del tratamiento con este agente es el bloqueo de las células en la fase S temprana, debido a la parada de las horquillas de replicación. A diferencia de la situación en *S. pombe* (Boddy y col., 2000; Doe y Whitby, 2004), los mutantes de *mus81* de *S. cerevisiae* son solo moderadamente sensibles al tratamiento crónico con HU en medio sólido, pero quisimos examinar el comportamiento de las células carentes de Mus81 tratadas con este agente durante una única fase S.

Para realizar estos estudios, las células se sincronizaron en la fase G1 con factor α y se liberaron posteriormente en la fase S en presencia de HU, durante 90 min. A este tiempo, y a la concentración de HU empleada (0,2 M), las horquillas de replicación replican aproximadamente 10 kb desde el origen de replicación, antes de quedar paradas por la reducción de los niveles de dNTPs (Santocanale y Diffley, 1998). Tras comprobar que más del 90% de las células habían gemado, dato indicativo de su entrada en la fase S, los cultivos se lavaron para eliminar la hidroximetilurea y se dejaron crecer en un medio fresco sin la droga (Fig. R16).

Los perfiles de citometría de flujo (Fig. R16A) muestran que las células están bloqueadas en la fase S temprana tras su tratamiento con HU, con un contenido de DNA próximo a 1C. Cuando el compuesto se elimina del medio, tanto las células del tipo silvestre como las del mutante *mus81* Δ avanzan sin problemas aparentes a través de la fase S y alcanzan el pico de DNA 2C aproximadamente al mismo tiempo. A los 120 min, se observan ya células de ambas cepas en un nuevo ciclo celular, lo que sugiere que tanto la replicación del DNA como la mitosis se han completado con éxito. Asimismo, el recuento de unidades formadoras de colonia en placa tras el tratamiento con HU indica que las células *mus81* Δ no muestran sensibilidad a este compuesto (Fig. R16B). Como se observa en la gráfica, tanto las células silvestres como las mutantes conservan una viabilidad celular en torno al 90% tras 90 min en presencia de HU en el medio. Todo ello sugiere que las horquillas de replicación mantienen su integridad en el mutante *mus81* Δ cuando son bloqueadas con HU y que la endonucleasa Mus81-Mms4 no es necesaria para el restablecimiento de la replicación tras el tratamiento con esta droga. Si bien no se muestran para hacer más sencilla la exposición de los resultados, se obtuvieron los mismos datos de perfil de citometría de flujo y viabilidad cuando las células se mantuvieron durante 3 h en presencia de HU 0,2 M en lugar de 90 min.

Para comprobar que, efectivamente, no existen problemas en la reanudación de la replicación cromosómica tras el bloqueo de las células con HU, como sugiere la citometría de flujo, estudiamos también el estado del *checkpoint* de la fase S a lo largo

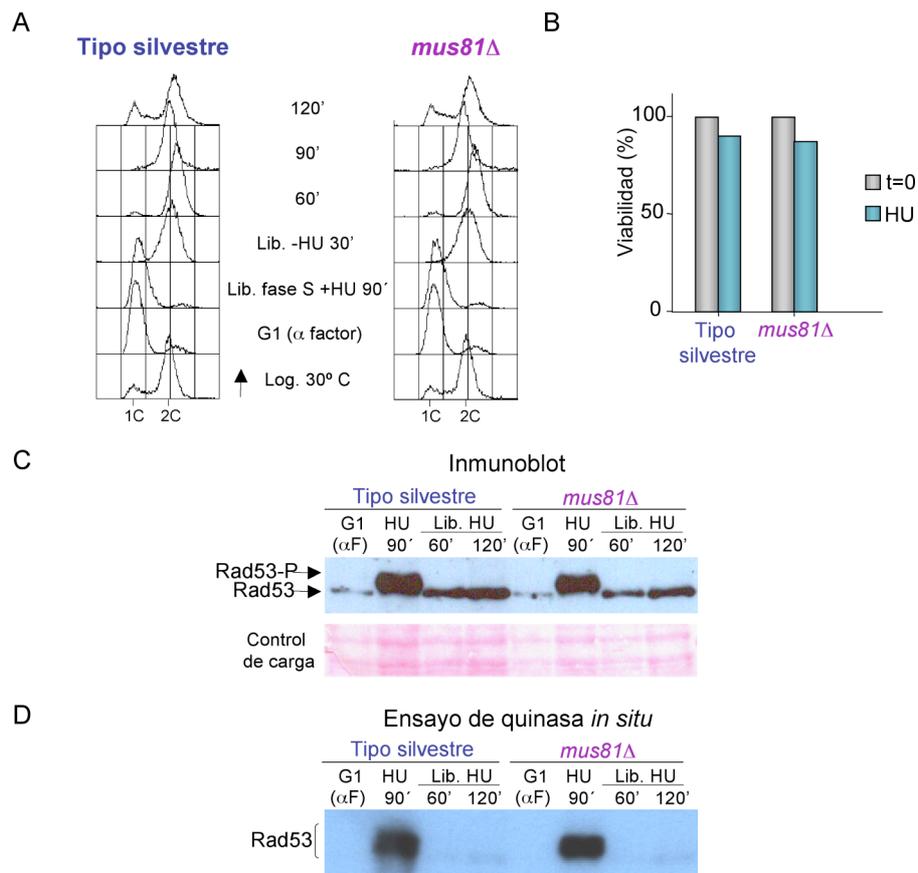


Figura R16. Análisis de la posible función de Mus81 en la respuesta al estrés replicativo. Las células se bloquearon en la fase G1 con la feromona factor α y se liberaron en un medio fresco en presencia de HU (0,2 M). Transcurridos 90 min, la hidroxurea se eliminó del medio y las células se liberaron en la fase S en un medio fresco. A lo largo del experimento se tomaron muestras para el análisis de la progresión en el ciclo mediante citometría de flujo, para la estimación de la viabilidad celular, y para la extracción de proteínas. (A): Perfiles de citometría de flujo de la cepa control (W303-1a) y del mutante *mus81Δ* (cepa YMV39). (B): Viabilidad celular de ambas cepas tras la liberación de las células del bloqueo en G1 y después de 90 min en presencia de HU en el medio. (C): Inmunoblot de Rad53. Se identificaron las formas no fosforilada (Rad53) y fosforilada (Rad53-P). La región de la membrana correspondiente a la migración de la proteína, teñida con Ponceau S, se muestra como control de carga. (D): Ensayos de actividad quinasa *in situ*. La autofosforilación de Rad53 se midió mediante la incorporación de γ -ATP marcado radioactivamente, empleando las mismas muestras proteicas analizadas mediante inmunoblot en (C).

del experimento. Un *checkpoint* activado nos indicaría directamente la existencia de perturbaciones durante la replicación, como por ejemplo la presencia de un número de horquillas bloqueadas que podrían pasar inadvertidas en la citometría. Para ello, analizamos la fosforilación y la actividad quinasa de Rad53. Como muestra el inmunoblot de la Fig. R16C, Rad53 se encuentra hiperfosforilada en las muestras que proceden de las células tratadas con HU, tanto en el tipo silvestre como en el mutante *mus81Δ*. Cuando las células de ambas cepas se liberan del bloqueo con HU y el avance en la fase S se restablece, como se muestra en la citometría de flujo, solamente se detecta la forma no fosforilada de Rad53 (Fig. R16C, 60 y 120 min en ausencia de HU), lo que indica que el *checkpoint* se ha desactivado y que, por tanto, no quedan horquillas de replicación bloqueadas, que estarían señalizando para activarlo. Para corroborar que, efectivamente, esta desactivación se había producido, llevamos a cabo ensayos de actividad quinasa *in situ*, como los descritos anteriormente (Apdos. 1.5 y 2.2), con las mismas muestras proteicas utilizadas en el inmunoblot. En la Fig. R16D se observa que la incorporación de γ -ATP marcado radioactivamente se detecta solo en las muestras

correspondientes al tratamiento con HU, lo cual confirma que a los 60 y 120 min de la eliminación de esta droga Rad53 ya no está activada.

En conjunto, estos experimentos sugieren fuertemente que Mus81-Mms4 no es necesaria para el mantenimiento de la integridad de las horquillas de replicación cuando las células son tratadas con HU ni para el restablecimiento de la replicación después de que las horquillas hayan estado bloqueadas por la reducción en los niveles de dNTPs. Es decir, Mus81-Mms4 no se requeriría para hacer frente al estrés replicativo provocado por la hidroxiurea en *S. cerevisiae*.

2.8. La endonucleasa Mus81-Mms4 no se requiere para el restablecimiento de la replicación cromosómica tras el tratamiento con hidroxiurea en *S. cerevisiae*

Los experimentos mostrados en el apartado anterior sugieren con bastante claridad que la nucleasa Mus81-Mms4 de *S. cerevisiae* no es necesaria para reanudar la replicación cromosómica tras el estrés replicativo provocado por el tratamiento con hidroxiurea. Para confirmar las conclusiones alcanzadas tras los resultados obtenidos, analizamos la dinámica de la replicación cromosómica empleando la técnica de electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE), tras tratar con HU a células del tipo silvestre y a mutantes *mus81Δ*.

En los experimentos que llevamos a cabo, las células del tipo silvestre y las mutantes *mus81Δ* se sincronizaron en la fase G1 con factor α y se liberaron posteriormente en la fase S en presencia de HU durante 90 min. A continuación, las células se lavaron para eliminar la hidroxiurea y se permitió su recuperación en ausencia de la droga durante 2 h en un medio fresco, al que se añadió nocodazol para bloquear las células en la fase G2/M e impedir su posible entrada en un nuevo ciclo celular. En el transcurso del experimento se tomaron muestras para el análisis mediante citometría de flujo y para la extracción de DNA genómico, que fueron procesadas para la electroforesis en gel de campo pulsado según lo explicado en Materiales y Métodos.

Tras la liberación del bloqueo en la fase G1 y 90 min en presencia de HU, tanto las células del tipo silvestre como las mutantes *mus81Δ* mostraron un porcentaje de gemación de aproximadamente el 90%, indicativo de su entrada en la fase S. Los perfiles de citometría de flujo obtenidos en el experimento (Fig. R17A), que muestran un contenido de DNA próximo a 1C, indican que ambas cepas permanecen en la fase S temprana tras su liberación del bloqueo en G1. Tras la eliminación de la hidroxiurea del medio, ambas cepas progresan en la fase S y alcanzan el contenido de DNA 2C aproximadamente al mismo tiempo, de acuerdo con los experimentos de la Fig. R16, y permanecen en G2/M debido a la presencia de nocodazol en el medio. Las imágenes de los geles sometidos a electroforesis de campo pulsado (Fig. R17B) muestran que, tanto en el mutante *mus81Δ* como en la cepa control, los cromosomas de las células sincronizadas en la fase G1 del ciclo están intactos y se separan a lo largo del gel como bandas discretas. Por el contrario, tras 90 min de tratamiento con HU, la mayor parte del DNA cromosómico queda retenido en los pocillos del gel, tanto en las células mutantes como en las silvestres, lo que indica que la replicación de los cromosomas se ha iniciado pero no se ha completado, de acuerdo con la citometría de flujo (Fig. R17A).

En ambas cepas, a los 60 min tras la eliminación de la hidroxurea del medio, el DNA cromosómico vuelve a entrar en el gel, y se detectan de nuevo los cromosomas en forma de bandas claras y discretas a lo largo del carril, de forma similar al perfil encontrado en células en la fase G1, lo que indica que la replicación del genoma se ha completado satisfactoriamente tanto en las células del tipo silvestre como en las carentes de la nucleasa.

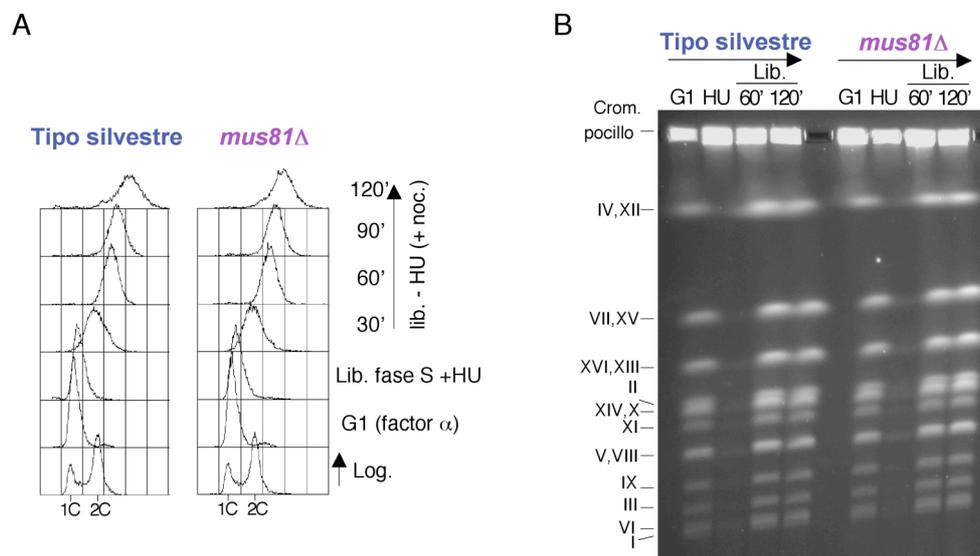


Figura R17. Análisis de la replicación cromosómica tras el tratamiento con hidroxurea (HU) en el mutante *mus81Δ* mediante electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE). Las células silvestres (cepa W303-1a) y las mutantes *mus81Δ* (cepa YMV39) se crecieron en un medio rico, se bloquearon en la fase G1 con factor α , y se liberaron en la fase S en presencia de HU 0,2 M. Tras 90 min, la hidroxurea se eliminó del medio y las células se liberaron en un medio fresco con nocodazol (5 mg/ml) durante 2 h. A lo largo del experimento se tomaron muestras celulares para la extracción de DNA genómico y su posterior análisis mediante electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE). (A) La progresión de ambas cepas en el ciclo celular se siguió a lo largo del experimento mediante análisis del contenido de DNA por citometría de flujo. (B) La figura muestra las imágenes de los resultados obtenidos en la electroforesis, tras la tinción de los geles con bromuro de etidio y su posterior desteñido. La posición en el gel del pocillo y de cada uno de los cromosomas de *S. cerevisiae* (marcados con números romanos), se indica a la izquierda de la figura.

Estos resultados confirman por tanto que, al menos en *S. cerevisiae*, tras una situación de estrés replicativo provocado por la acción de la hidroxurea, que produce el bloqueo de las horquillas de replicación, Mus81 no es necesaria para el restablecimiento y completación de la replicación cromosómica.

2.9. Mus81-Mms4 no sufre modificaciones postraduccionales detectables durante la fase S como consecuencia del daño en el DNA o el bloqueo de las horquillas de replicación

Para avanzar en el conocimiento del papel de Mus81-Mms4, analizamos a continuación la posible existencia de modificaciones postraduccionales en ambas subunidades del complejo que pudieran ser detectables mediante inmunoblot, tanto en condiciones de daño en el DNA como en una situación de estrés replicativo. En el caso de conseguir resultados positivos, se podría obtener información sobre la regulación de este heterodímero. Un trabajo previo (Ehmsen y Heyer, 2008) ha mostrado que ambas subunidades del complejo pueden estar fosforiladas cuando son purificadas, tanto

constitutivamente como en respuesta a estrés genotóxico, si bien se desconoce la relevancia de esta modificación para la función de la nucleasa *in vivo*. Además, a pesar de que hemos mostrado previamente que Mus81-Mms4 no es necesaria para hacer frente a las consecuencias del tratamiento con HU en una única fase S (Apdo. 2.3), en *S. pombe* Mus81 se fosforila en presencia de este compuesto (Boddy y col., 2000; Kai y col., 2005), por lo que quisimos analizarlo también en *S. cerevisiae*.

Para llevar a cabo estos estudios, se etiquetaron las subunidades Mus81 y Mms4 con tres copias del epítipo HA, según se describe en Materiales y Métodos. Estas cepas fueron viables y no mostraron variaciones en el crecimiento o en la sensibilidad al MMS con respecto al tipo silvestre. Las células *MUS81-HA* y *MMS4-HA* se bloquearon en la fase G1 con factor α . Una vez sincronizadas, cada uno de los cultivos se lavó para eliminar la feromona y se dividió en tres: en uno de ellos, las células se liberaron en la fase S en un medio fresco; en los otros dos, se resuspendieron en un medio fresco en presencia de MMS e HU, respectivamente. En el transcurso del experimento se tomaron muestras para la extracción de proteínas y para el análisis mediante citometría de flujo.

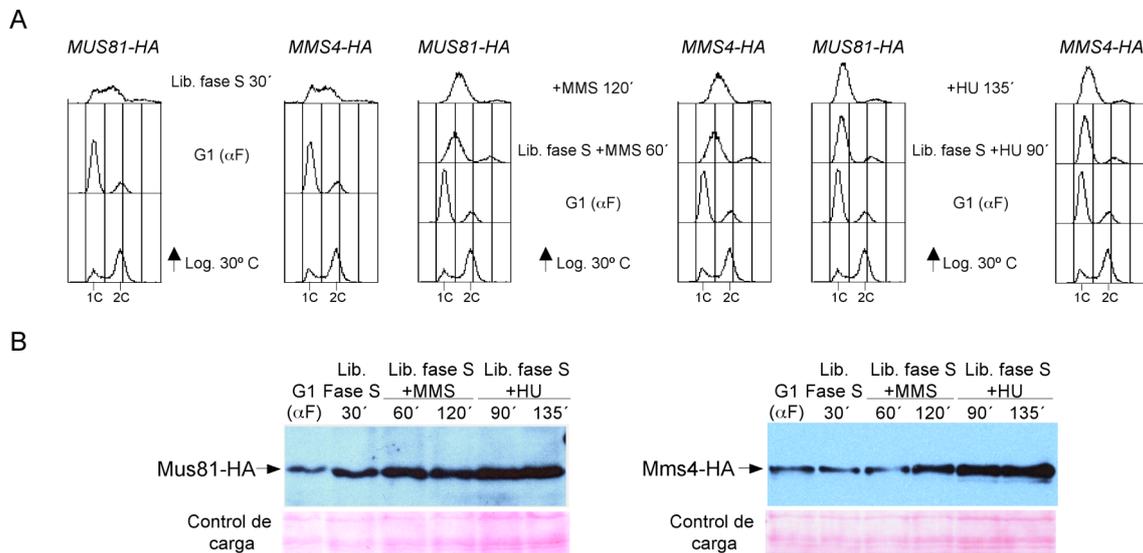


Figura R18. Estudio de las posibles modificaciones postraduccionales del complejo Mus81-Mms4 en respuesta al daño en el DNA o al estrés replicativo. Las células *MUS81-HA* (cepa YMV20) y *MMS4-HA* (cepa YMV33) se crecieron en un medio rico y se bloquearon en la fase G1 con factor α . A continuación, cada uno de los cultivos se lavó y dividió en tres: en el primero, las células se liberaron del bloqueo en un medio fresco, mientras que en los otros dos se liberaron en la fase S en presencia de MMS (0,033%) y de HU (0,2 M), respectivamente. (A): Perfil de citometría de flujo para cada una de las cepas, durante la liberación de las células en la fase S en condiciones normales (izquierda), en presencia de daño en el DNA causado por MMS (centro) o en condiciones de estrés replicativo originado por el tratamiento con HU (derecha). (B): Inmunoblots de Mus81 (izquierda) y de Mms4 (derecha) a partir de muestras tomadas a los tiempos indicados. En cada caso, se empleó como control de carga una zona de la membrana correspondiente a la migración de cada proteína, teñida con Ponceau S.

Los perfiles de citometría de flujo de la Fig. R18A indican que, como se esperaba, ambas cepas se comportan de manera idéntica y de modo similar a un tipo silvestre, detectándose un desplazamiento de las células hacia el pico 2C cuando se liberan del bloqueo en G1 en ausencia de daño o estrés replicativo, un avance lento pero gradual en la fase S en presencia de MMS, y un bloqueo en la fase S temprana durante el tratamiento con HU.

Como muestran los inmunoblots (Fig. R18B), no se detectaron variaciones en la movilidad electroforética de las proteínas de fusión Mus81-HA y Mms4-HA, ni la presencia de bandas dobles o múltiples en ninguna de las condiciones analizadas. Esto quiere decir que, en *S. cerevisiae*, ninguna de las subunidades de la endonucleasa Mus81-Mms4 sufre modificaciones en condiciones de estrés replicativo o daño en el material genético durante la fase S, al menos de forma detectable *in vivo* mediante nuestras condiciones experimentales. En el caso del tratamiento con HU, el resultado es diferente al observado con Mus81 en *S. pombe*, lo que sugiere que estas proteínas homólogas podrían funcionar de modo diferente en las dos levaduras.

2.10. La unión del complejo Mus81-Mms4 a la cromatina podría estar regulada en respuesta al daño en el DNA

Para profundizar en el análisis de la posible regulación de Mus81-Mms4 en respuesta al daño en el DNA durante la replicación cromosómica, examinamos la capacidad de interacción de esta nucleasa con la cromatina, tanto en presencia como en ausencia de lesiones en el material genético. Como se ha explicado en la Introducción, ambas subunidades del complejo contienen potenciales dominios de unión al DNA, por lo que cabría esperar una asociación de las mismas con la cromatina para realizar su función. Para llevar a cabo estos estudios, utilizamos un ensayo basado en la técnica desarrollada por Donovan y col. (1997), con las modificaciones descritas en Materiales y Métodos. En estos ensayos, un extracto celular total se fracciona por centrifugación en una fracción cromatínica y un sobrenadante, lo que resulta en una purificación de la cromatina de unas 20 veces. La presencia de proteínas específicas en cada fracción puede determinarse por inmunoblot y, para ello, utilizamos las cepas descritas en el apartado anterior, en las que Mus81 y Mms4 se expresan como proteínas de fusión con el epítipo HA.

Las células *MUS81-HA* y *MMS4-HA* se sincronizaron en la fase G1 y se liberaron en la fase S, en ausencia y en presencia de MMS, y se examinó en ambas situaciones la posibilidad de que tanto Mus81 como Mms4 estuvieran presentes en la fracción cromatínica. La entrada de las células en la fase S fue comprobada por citometría de flujo y por análisis del índice de gemación. Como se observa en los controles de carga de los inmunoblots de la Fig. R19, tanto en el experimento realizado con Mus81-HA como en el llevado a cabo con Mms4-HA, cuando las fracciones resultantes de la purificación se analizan por electroforesis en gel de acrilamida en presencia de SDS, menos del 5% de las proteínas celulares totales se encuentran en la fracción cromatínica. Sin embargo, una cantidad significativa y reproducible de la subunidad catalítica Mus81 se halla en esta fracción, tanto en una fase S normal como en las muestras obtenidas de células tratadas con MMS (Fig. R19). En ambos casos, cuando los extractos se incuban con NaCl 250 mM previamente a su fraccionamiento, Mus81 se separa de la fracción cromatínica y se encuentra únicamente en el sobrenadante. Este tratamiento también elimina de la cromatina proteínas implicadas en la replicación del DNA como ORC, Cdc6 o Pol α , como se ha demostrado previamente (Donovan y col., 1997; Desdouets y col., 1998).

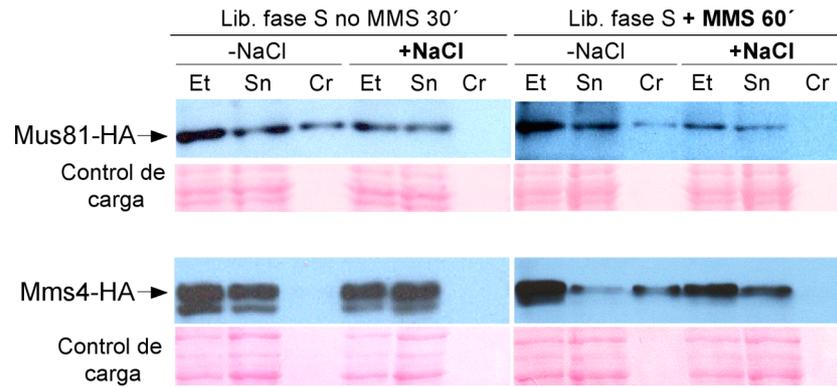


Figura R19. Ensayos de unión a cromatina de Mus81 y Mms4. Las células se crecieron en un medio rico, se sincronizaron en la fase G1 y se liberaron en la fase S en ausencia de MMS, durante 30 min, y en presencia de una concentración de 0,033% del agente alquilante, durante 60 min. Las muestras proteicas obtenidas tras los ensayos de unión a cromatina se sometieron a electroforesis en geles de poliacrilamida y se analizaron mediante inmunoblot. Mus81-HA (cepa YMV20); Mms4-HA (cepa YMV33). La región de la membrana correspondiente a la migración de cada una de las proteínas se empleó como control de carga tras su tinción con Ponceau S. *Et*: Extracto proteico total; *Sn*: Fracción correspondiente al sobrenadante; *Cr*: Fracción cromatínica.

A diferencia de Mus81, la subunidad reguladora Mms4 se detecta con dificultad en la fracción cromatínica procedente de muestras obtenidas en ausencia de daño en el DNA. Sin embargo, cuando las células son tratadas con MMS, una importante fracción de Mms4 se encuentra claramente unida a la cromatina (Fig. R19). Al igual que en el caso de Mus81, Mms4 se elimina de la fracción cromatínica cuando las muestras son incubadas con NaCl previamente al fraccionamiento.

Estos resultados sugieren que la actuación de la endonucleasa Mus81-Mms4 durante la replicación cromosómica en presencia de daño en el DNA podría estar controlada mediante la unión de la subunidad reguladora Mms4 a la cromatina, lo que quizás permitiría la formación y posible activación del complejo.

2.11. La función de Mus81-Mms4 en la respuesta al daño en el DNA durante la replicación cromosómica no está regulada por el *checkpoint* de la fase S en *S. cerevisiae*

En *S. pombe*, Mus81 aparece fosforilada cuando las células son tratadas con HU, y parcialmente cuando lo son con camptotecina. Esta fosforilación depende de Cds1, y en el caso de la exposición a HU provoca el desplazamiento de Mus81 de la cromatina (Kai y col., 2005). A pesar de que no hemos detectado modificaciones de ninguna de las subunidades de Mus81-Mms4, ambas poseen motivos TXXD (dos en el caso de Mus81 y tres en la subunidad Mms4) de posible unión al dominio FHA de Rad53 (Durocher y col., 1999; Durocher y col., 2000; Aucher y col., 2010). Por ello, quisimos estudiar si esta nucleasa podría estar regulada de algún modo por el *checkpoint* de la fase S durante la respuesta celular al daño en el DNA.

2.11.1. La delección de *MUS81* no revierte el fenotipo de hipersensibilidad del mutante *rad53Δ* al tratamiento con MMS durante la fase S

Se ha propuesto que Cds1 podría ejercer una regulación negativa sobre Mus81 en *S. pombe* cuando las células son tratadas con HU, desplazándola de la cromatina (Kai

y col., 2005), como se ha descrito anteriormente. Aunque las implicaciones funcionales de esta observación no están claras, dado que los mutantes *mus81* Δ de *S. pombe* no son sensibles a la exposición a esta droga durante unas pocas horas -a diferencia de la exposición crónica por crecimiento en placa-, quisimos analizar si la proteína Mus81 de *S. cerevisiae* podría estar regulada negativamente por Rad53 cuando las células son tratadas con MMS durante la fase S. Razonamos que, si así fuera, la delección del gen *MUS81* en el mutante del *checkpoint* *rad53* Δ *sml1* Δ generaría un rescate de la viabilidad celular.

Con el fin de analizar esta hipótesis, se construyeron mediante sustitución génica las cepas *mus81* Δ *sml1* Δ y *rad53* Δ *sml1* Δ *mus81* Δ . Estas células, al igual que las mutantes *rad53* Δ *sml1* Δ , se sincronizaron en la fase G1 del ciclo y se liberaron en la fase S en ausencia y en presencia de 0,01% de MMS. En todos los casos, las células se liberaron en un medio con nocodazol para prevenir la entrada prematura en la mitosis que tiene lugar en los mutantes del *checkpoint* cuando son tratados con MMS a pesar de no haber terminado la replicación del DNA, lo que tendría influencia en los resultados de viabilidad, recogidos en la gráfica de la Fig. R20.

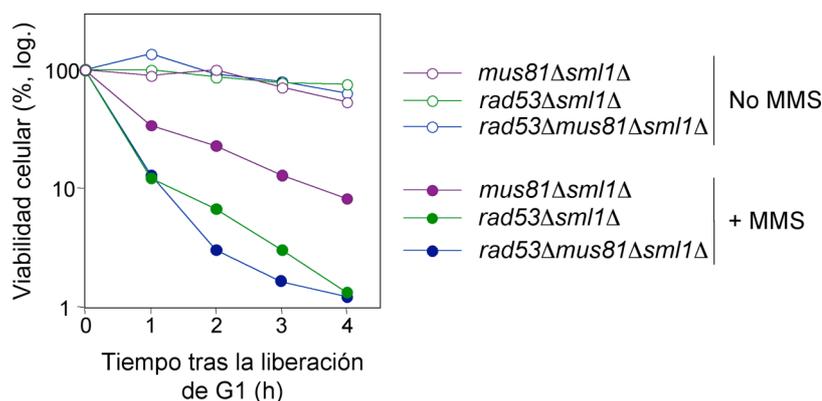


Figura R20. Sensibilidad del mutante *rad53* Δ *sml1* Δ al tratamiento con MMS en ausencia de Mus81. Las células *mus81* Δ *sml1* Δ (cepa YMV19), *rad53* Δ *sml1* Δ (cepa YJT75) y *rad53* Δ *mus81* Δ *sml1* Δ (cepa YMV18) se crecieron en un medio rico, se sincronizaron en la fase G1 del ciclo con factor α , y se liberaron en la fase S en presencia de nocodazol (5 μ g/ml), tanto en ausencia como en presencia de 0,01% MMS. La viabilidad de cada una de las cepas en el transcurso del experimento se examinó mediante el recuento de unidades formadoras de colonias en placa.

Como se muestra en la gráfica (Fig. R20), cuando estos mutantes se liberan en la fase S en ausencia de MMS, la viabilidad celular se mantiene alta y constante. Cuando se tratan con MMS, el mutante *mus81* Δ *sml1* Δ manifiesta una sensibilidad moderada frente a esta dosis del agente alquilante, que se incrementa con el tiempo de exposición al mismo. Como se esperaba, el mutante *rad53* Δ *sml1* Δ muestra una alta sensibilidad al MMS, incluso a esta baja concentración. Como se observa en la Fig. R20, la delección de *MUS81* en esta cepa no produce la recuperación de la viabilidad celular del mutante del *checkpoint* *rad53* Δ tras el tratamiento con MMS durante la fase S. Por el contrario, se obtiene una sensibilidad similar al caso anterior, lo que indica que la eliminación de la endonucleasa Mus81-Mms4 no suprime ni alivia el fenotipo de sensibilidad al MMS del mutante *rad53* Δ *sml1* Δ durante la fase S, ni tampoco tiene efectos aditivos sobre el mismo. Esto sugiere que Mus81-Mms4 no está regulada directamente por Rad53 en *S.*

cerevisiae o que, en caso de estarlo, la sensibilidad de las células carentes de esta quinasa se debe a su falta de control sobre otros sustratos.

2.11.2. La unión de Mus81-Mms4 a la cromatina es independiente de Mec1/Rad53

A continuación quisimos conocer si, de un modo similar a lo observado en *S. pombe* (Kai y col., 2005), el *checkpoint* de la fase S ejerce algún tipo de regulación sobre la asociación del complejo Mus81-Mms4 a la cromatina. Para ello, también etiquetamos la subunidad Mms4 con el epítipo HA en las cepas *mec1Δsml1Δ* y *rad53Δsml1Δ*, y llevamos a cabo el mismo tipo de ensayos descritos en el apartado 2.10. Así, las células *mec1Δsml1ΔMMS4-HA* y *rad53Δsml1ΔMMS4-HA* se crecieron en un medio rico, se bloquearon en la fase G1 del ciclo y se liberaron en la fase S en ausencia y en presencia de MMS. En este caso, los cultivos fueron tratados con la droga durante solo 30 min, debido a que la inactivación del *checkpoint* en estos mutantes hace que la fase S sea más rápida. Los resultados obtenidos se muestran en la Fig. R21. La entrada de las células en la fase S y el avance a través de la misma fue comprobado mediante citometría de flujo y por el análisis del índice de gemación.

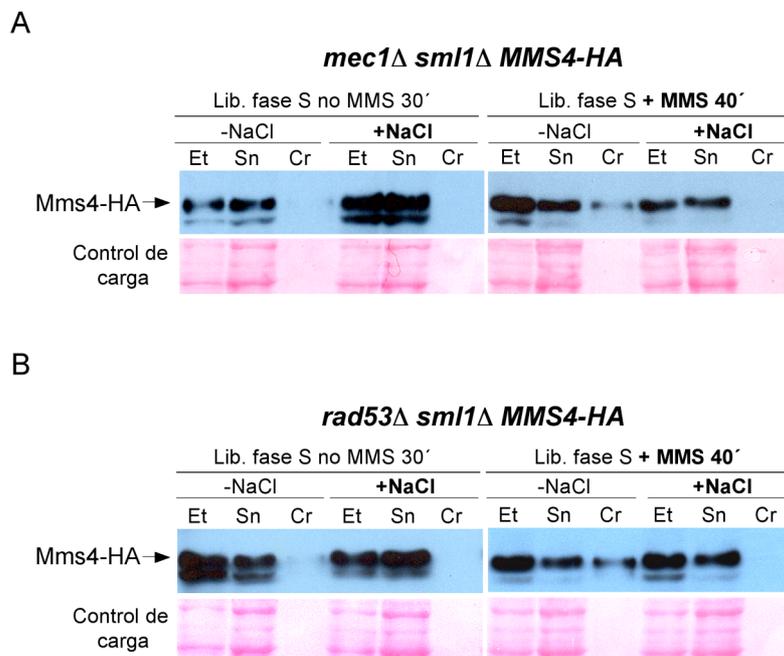


Figura R21. Ensayos de unión a cromatina de Mms4 en mutantes del *checkpoint* de la fase S. Las células se crecieron en un medio rico, se sincronizaron en la fase G1 y se liberaron en la fase S en ausencia de MMS, durante 30 min, y en presencia de una concentración de 0,033% del agente alquilante, durante 40 min. Las muestras proteicas obtenidas tras los ensayos de unión a cromatina se sometieron a electroforesis en geles de poliacrilamida y se analizaron mediante inmunoblot. (A) *mec1Δsml1ΔMMS4-HA* (cepa YMV37) y (B) *rad53Δsml1ΔMMS4-HA* (cepa YMV38). La región de la membrana correspondiente a la migración de cada una de las proteínas se empleó como control de carga tras su tinción con Ponceau S. *Et*: Extracto proteico total; *Sn*: Fracción correspondiente al sobrenadante; *Cr*: Fracción cromatínica.

En ambas cepas, los controles de carga de cada uno de los inmunoblots confirman que menos del 5% del total de proteínas celulares aparece en la fracción cromatínica (Fig. R21A-B). Al igual que ocurría en el caso de las células del tipo silvestre (Fig. R19), Mms4 se detecta en el extracto cromatínico procedente de las muestras obtenidas en presencia de MMS en el medio, tanto en la cepa *mec1Δsml1Δ*

(Fig. R21A) como en el mutante *rad53Δsml1Δ* (Fig. R21B), y se elimina de esta fracción cuando las muestras son incubadas con NaCl antes de su fraccionamiento. Del mismo modo, en estos mutantes *Mms4* no aparece unida a la cromatina en las muestras procedentes de las células liberadas en la fase S en ausencia del agente alquilante.

Por tanto, podemos concluir que la asociación de la subunidad reguladora de la endonucleasa *Mus81-Mms4* a la cromatina durante la replicación en presencia de alquilaciones en el material genético es un hecho independiente del *checkpoint* de la fase S.

2.12. *Mus81-Mms4* coopera con la resolvasa *Yen1* para hacer frente al daño en el DNA durante la replicación cromosómica

Como se ha explicado en la Introducción, la delección de *YEN1* en un mutante *mus81Δ* incrementa notablemente la sensibilidad de este último al tratamiento con MMS (Blanco y col., 2010), a pesar de que las células deficientes en la resolvasa son muy poco sensibles a la exposición a este compuesto. Estos resultados se obtuvieron sometiendo a las diferentes cepas a un tratamiento crónico con MMS y observando su crecimiento en placa. La elevada sensibilidad podría deberse a la acumulación de problemas en más de un ciclo celular, y quisimos estudiar si en una fase S única en la que las células fueran tratadas con MMS, la progresión en la misma y la sensibilidad del mutante *mus81Δ* podrían verse afectadas por la ausencia de *Yen1*.

2.12.1. Construcción y caracterización de las cepas *yen1Δ* y *mus81Δyen1Δ*

Para analizar la cuestión planteada en el párrafo anterior, construimos mediante sustitución génica un mutante de delección *yen1Δ* y un doble mutante *mus81Δyen1Δ* (ver Materiales y Métodos). La obtención de las cepas fue comprobada mediante PCR y su viabilidad por crecimiento a diferentes temperaturas. Seguidamente, se calculó el tiempo de generación de cada una de ellas y, si bien la cepa *yen1Δ* no mostró diferencias significativas en el crecimiento con respecto al tipo silvestre, el tiempo de generación estimado para la cepa *mus81Δyen1Δ* fue de 2 h, aproximadamente 30 min más que el control y los mutantes simples *yen1Δ* y *mus81Δ*. Este crecimiento lento está de acuerdo con lo descrito para el mutante *mus81Δyen1Δ*, aun siendo otro fondo genético (Blanco y col., 2010). Además, se estudió la morfología mediante microscopía óptica y se observó, como se describe en la literatura (Blanco y col., 2010; Ho y col., 2010), que estas células sufren un importante bloqueo en la fase G2/M del ciclo, acumulándose con gemas grandes. Este resultado indica que, mientras que la presencia de una sola de estas nucleasas es suficiente para llevar a cabo un ciclo celular normal, la ausencia de ambas tiene un efecto negativo para el crecimiento, lo que sugiere funciones complementarias entre ambas.

2.12.2. *Mus81* y *Yen1* cooperan durante la fase S en la respuesta al daño en el DNA originado por el MMS

Para estudiar la cooperación entre *Mus81* y *Yen1* en la respuesta al daño en el DNA durante la replicación cromosómica, se sincronizaron células del tipo silvestre y mutantes *mus81Δ*, *yen1Δ* y *mus81Δyen1Δ* en la fase G1 del ciclo celular, mediante la adición de factor α , y se liberaron a continuación en la fase S en ausencia y en presencia

de distintas concentraciones de MMS. A lo largo del experimento se tomaron muestras celulares para analizar la progresión en la fase S y la viabilidad celular. En la Fig. R22 A-D se muestran los perfiles de citometría de flujo de cada una de las cepas. Para mayor claridad y sencillez en la exposición de los resultados, solo se presenta la citometría correspondiente al tratamiento de las células con la mayor concentración de MMS utilizada, 0,033%.

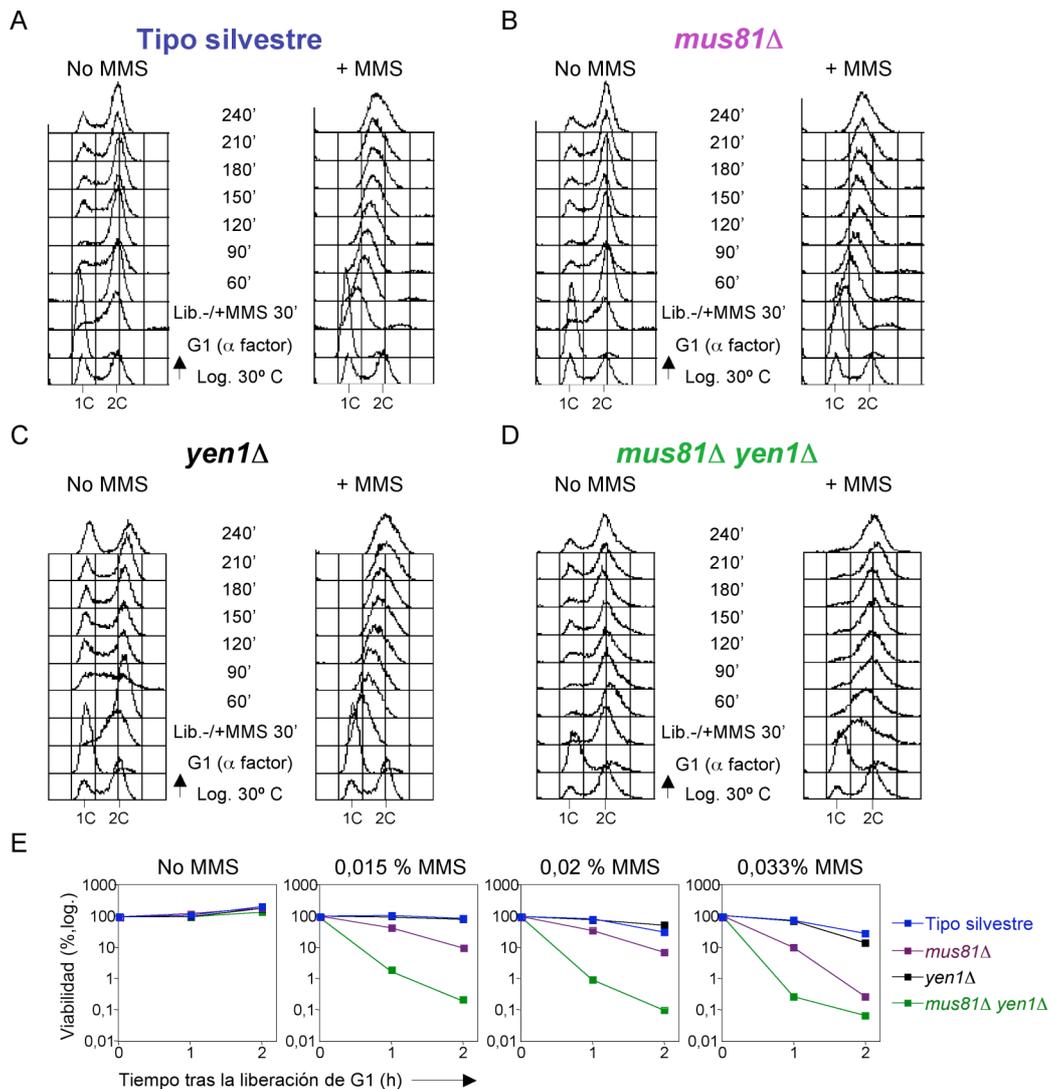


Figura R22. Progresión en la fase S y viabilidad celular de los mutantes *yen1* Δ y *mus81* Δ *yen1* Δ en presencia de daño en el DNA. Las células se crecieron en un medio rico, se bloquearon en la fase G1 con factor α y se liberaron en la fase S en ausencia y en presencia de MMS a distintas concentraciones (0,015%, 0,02% y 0,033%). (A-D): Determinación del contenido en DNA a lo largo del experimento mediante citometría de flujo. Se representa el resultado obtenido con la mayor concentración de MMS utilizada, 0,033%. (A) tipo silvestre (W303-1a), (B) *mus81* Δ (cepa YMV39), (C) *yen1* Δ (cepa YJT161) y (D) *mus81* Δ *yen1* Δ (cepa YJT162). (E): Viabilidad celular del tipo silvestre y de cada uno de los mutantes, en ausencia y en presencia de MMS a las diferentes concentraciones utilizadas.

En todos los casos, tras la liberación del bloqueo en G1 en la fase S en ausencia de MMS, las células avanzan de forma aparentemente normal en la misma, finalizándola aproximadamente a los 60 min, y entrando posteriormente en un nuevo ciclo celular. Como se observa en la Fig. R22D, en el caso del mutante *mus81* Δ *yen1* Δ ,

las células quedan parcialmente retenidas en G2/M (pico de DNA 2C) y tardan más tiempo en entrar en un nuevo ciclo, de acuerdo con lo descrito anteriormente. Estos resultados sugieren que, al igual que Mus81 (Apdo. 2.1), Yen1 no es necesaria durante una fase S normal, y que los problemas de crecimiento del doble mutante se deben al bloqueo de las células en la fase G2/M, como sugerían las observaciones al microscopio óptico. Si las células entran en la fase S en presencia de MMS, la progresión a través de la misma se encuentra ralentizada en todas las cepas, y no se observan diferencias significativas entre los perfiles de citometría del tipo silvestre y de *yen1Δ*, así como de *mus81Δ*, como ya habíamos mostrado (Apdo. 2.1). En el caso de *mus81Δyen1Δ*, la fase S es algo más rápida que en las otras cepas, al menos aparentemente. Esto podría deberse a un defecto en la activación de Rad53, que impediría la inhibición de los orígenes de replicación tardíos, si bien esta posibilidad se descarta por los experimentos que se describen posteriormente, que muestran que el *checkpoint* de la fase S es funcional en las células *mus81Δyen1Δ*. Pensamos que los problemas de crecimiento de esta cepa, que originan una acumulación en G2/M e impiden su completa sincronización en la fase G1, podrían simular el efecto de que un mayor número de células habría acabado la fase S, cuando en realidad una cantidad significativa de las mismas habría quedado retenida previamente con un contenido de DNA 2C.

Con respecto a la viabilidad celular, las gráficas de la Fig. R22E muestran que las células *yen1Δ*, a diferencia del mutante *mus81Δ*, son muy poco sensibles al tratamiento con MMS durante la fase S, incluso a la concentración más elevada del agente alquilante. Por tanto, el papel de Yen1 en la respuesta celular al daño en el DNA originado por MMS durante la fase S parece poco relevante, a diferencia del que tiene Mus81. Sin embargo, las células *mus81Δyen1Δ* sufren una pérdida drástica de la viabilidad celular -muy superior a la del mutante *mus81Δ*- tras la exposición a cualquiera de las concentraciones de MMS utilizadas, mostrando un número muy bajo de unidades formadoras de colonia tras la primera hora de tratamiento con dicho agente. Por tanto, estos resultados indican que Mus81 y Yen1 cooperan en la respuesta celular al daño en el DNA durante la fase S, teniendo posiblemente funciones complementarias o solapantes que permiten hacer frente a las lesiones existentes en el material genético.

2.12.3. El *checkpoint* de la fase S es funcional en ausencia de Yen1

Al igual que en el caso del mutante *mus81Δ* descrito previamente, para afirmar con seguridad que la elevada sensibilidad de las células *mus81Δyen1Δ* a la exposición al MMS se debe a la ausencia de las proteínas Mus81 y Yen1, y no a un *checkpoint* defectivo que causaría resultados similares, comprobamos que Rad53 se activaba y era funcional en los experimentos realizados. Para ello, las células mutantes *yen1Δ* y *mus81Δyen1Δ* se sincronizaron en la fase G1 y se liberaron posteriormente en ausencia y en presencia de MMS en el medio. En el caso del mutante *yen1Δ* (Fig. R23A), el inmunoblot y el ensayo de actividad quinasa *in situ* indican que Rad53 se hiperfosforila únicamente durante la fase S y solo en presencia de MMS en el medio, y que esta fosforilación se correlaciona con la adquisición de su propia capacidad para autofosforilarse y, por tanto, con su activación. En el caso del doble mutante *mus81Δyen1Δ*, además de detectarse la forma hiperfosforilada de Rad53 durante la fase S en presencia de MMS en el medio (Fig. R23B), se observa una modificación de esta

proteína también en ausencia de dicho agente (180-240 min), que podría indicar una leve fosforilación. Sin embargo, como confirma el ensayo de actividad quinasa *in situ* llevado a cabo con las mismas muestras proteicas, dicha modificación no es capaz de activar Rad53, que solo adquiere la capacidad de autofosforilarse durante la fase S en respuesta al daño en el DNA. Un trabajo reciente ha propuesto la existencia de bajos niveles de activación de Rad53 en ausencia de daño exógeno en este doble mutante (Ho y col., 2010). Sin embargo, dado el bloqueo que sufren estas células en la fase G2/M, el doblete de Rad53 detectado podría ser consecuencia de los problemas en la transición en el ciclo celular, y no de una situación de daño en el DNA, como se ha descrito previamente (Tercero y col., 2003; Schleker y col., 2010).

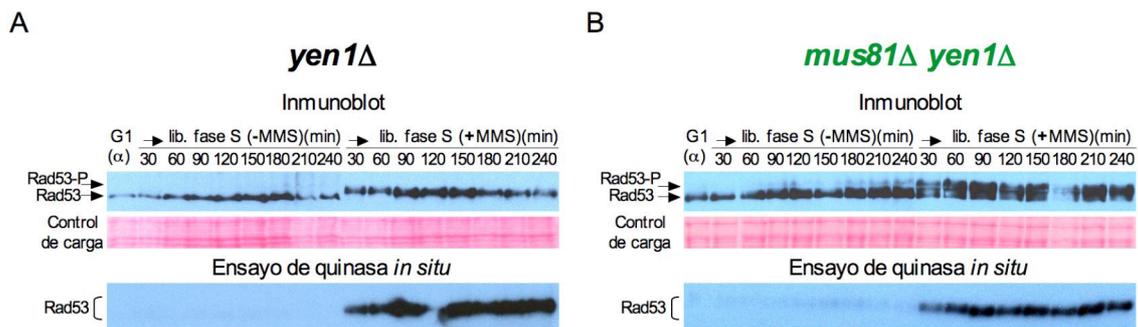


Figura R23. Actividad del *checkpoint* de la fase S en los mutantes *yen1Δ* y *mus81Δyen1Δ*. Las células se sincronizaron en la fase G1 y se liberaron en la fase S en ausencia y en presencia de MMS (0,033%). Durante 4 h, a intervalos de 30 min, se tomaron muestras celulares para la extracción de proteínas, que se utilizaron en el análisis del estado de la fosforilación de Rad53 por inmunoblot (panel superior) y de la actividad quinasa de Rad53 mediante incorporación *in situ* de γ -ATP marcado radioactivamente (panel inferior). En el inmunoblot se señalan mediante flechas las formas fosforilada (Rad53-P) y no fosforilada (Rad53) de esta proteína. Como control de carga de cada uno de los geles se muestra, teñida con Ponceau S, la zona de la membrana correspondiente a la migración de Rad53. (A) *yen1Δ* (cepa YJT161) y (B) *mus81Δyen1Δ* (cepa YJT162).

Por tanto, el *checkpoint* de la fase S está activo y es funcional en los mutantes *yen1Δ* y *mus81Δyen1Δ*, y la acentuada pérdida de la viabilidad celular en este último se debe a la ausencia de las proteínas Yen1 y Mus81 y no a un *checkpoint* defectivo.

2.13. Yen1 no es necesaria para hacer frente al estrés replicativo en *S. cerevisiae*

Como se ha mostrado en el apartado 2.3, Mus81 no es necesaria para el restablecimiento de la replicación tras el tratamiento de las células con HU en una única fase S. Asimismo, el mutante *mus81Δ* es muy poco sensible a la exposición crónica a este compuesto, como se observa en los experimentos de crecimiento en placa, a diferencia de lo que ocurre en *S. pombe* (Kai y col., 2005). Sin embargo, el doble mutante *mus81Δyen1Δ* manifiesta una importante sensibilidad al tratamiento continuado con HU en medio sólido (Blanco y col., 2010; Ho y col., 2010). Esto sugiere que las diferencias en la respuesta a la exposición crónica a HU entre *S. cerevisiae* y *S. pombe* podrían deberse a que no parece existir un ortólogo de *YEN1* en esta última, donde Mus81 podría ejercer la función de las dos proteínas. Teniendo en cuenta estos datos de sensibilidad, quisimos estudiar el comportamiento del mutante *mus81Δyen1Δ* tras el tratamiento con HU durante una única fase S, de forma análoga a lo realizado en el apartado 2.3. Así, analizamos si la reanudación de la replicación se ve afectada en

ausencia de ambas nucleasas después del bloqueo de las horquillas de replicación, aun cuando no lo está en un mutante de *mus81* en *S. pombe* (Kai y col., 2005) (Fig. R24).

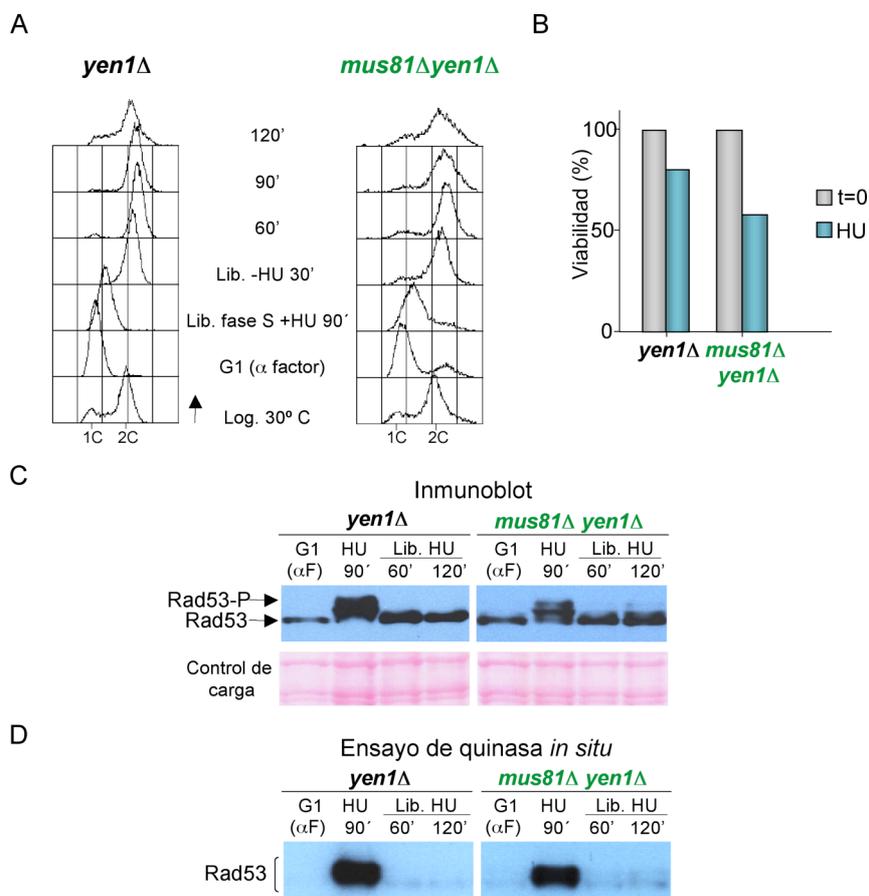


Figura R24. Análisis de la posible función de Yen1 en la respuesta al estrés replicativo. Las células *yen1Δ* (cepa YJT161) y *mus81Δyen1Δ* (cepa YJT162) se bloquearon en la fase G1 y se liberaron durante 90 min en un medio fresco en presencia de HU (0,2 M). A continuación, se eliminó la hidroxurea del medio y se dejó progresar a las células en el ciclo celular durante 120 min. (A): Perfiles de citometría de flujo. (B): Viabilidad celular tras la liberación de las células del bloqueo en G1 y después de 90 min en presencia de HU en el medio. (C): Inmunoblots de Rad53. Se identificaron las formas no fosforilada (Rad53) y fosforilada (Rad53-P). La región de la membrana correspondiente a la migración de la proteína, teñida con Ponceau S, se muestra como control de carga. (D): Ensayos de actividad quinasa *in situ* para Rad53. La autofosforilación de esta proteína se midió mediante la incorporación de γ -ATP marcado radioactivamente, empleando las mismas muestras proteicas analizadas mediante inmunoblot en (C).

Para llevar a cabo estos estudios, las células *yen1Δ* y *mus81Δyen1Δ* fueron liberadas en la fase S en presencia de HU tras su sincronización previa en la fase G1. Transcurridos 90 min, la droga se eliminó del medio y las células se resuspendieron en un medio fresco, analizándose su progresión en el ciclo celular. Los perfiles de citometría de flujo (Fig. R24A) indican que, una vez liberadas del bloqueo con HU, ambas cepas son capaces de reanudar la replicación y finalizar la fase S, sin que se observen diferencias significativas entre ellas.

La viabilidad celular fue analizada también en el transcurso del experimento y, como se observa en la Fig. R24B, en el mutante *yen1Δ* se mantiene muy elevada tras el tratamiento con HU (aproximadamente el 80%), cifra muy similar a la detectada en estas condiciones en el caso de la cepa silvestre y del mutante *mus81Δ* (Fig. R12B). En el mutante *mus81Δyen1Δ*, si bien la viabilidad celular es alta, decae ligeramente, hasta

aproximadamente el 60% (Fig. R24B). Estos resultados indican por tanto que, en ausencia de las endonucleasas Mus81 y Yen1, las horquillas de replicación mantienen de forma mayoritaria su integridad cuando son bloqueadas por la acción de la hidroxiurea.

Para comprobar que la replicación se reanuda de forma satisfactoria en estos mutantes tras el tratamiento con HU, como sugiere la citometría de flujo, analizamos el estado del *checkpoint* de la fase S en el transcurso de los experimentos. Para ello, se examinó la fosforilación de Rad53 y su actividad quinasa. Como se ha explicado en el Apdo. 2.7, un *checkpoint* activado indicaría la presencia de perturbaciones, es decir, de horquillas bloqueadas. Como muestran los inmunoblots de la Fig. R24C, Rad53 aparece hiperfosforilada en ambas cepas solamente en las muestras procedentes de células tratadas con HU, cuando las horquillas de replicación están bloqueadas. Tras la liberación del bloqueo causado por esta droga, Rad53 se defosforila, lo que indica que la replicación se ha restablecido y que el *checkpoint* se ha desactivado. Además, en los ensayos de quinasa *in situ* solo se detecta incorporación significativa de γ -ATP marcado radioactivamente en las muestras tratadas con HU (Fig. R24D), lo que demuestra que la defosforilación de Rad53 provoca su inactivación. El tenue doblete que aparece en el doble mutante tras la eliminación de la HU no supone que Rad53 permanezca parcialmente activada, ya que, como se ha explicado en el apartado anterior, en estas muestras la proteína no tiene capacidad de autofosforilarse.

Los resultados de este apartado indican, por tanto, que las proteínas Yen1 y Mus81 no son necesarias para el mantenimiento de la estabilidad de las horquillas de replicación cuando son bloqueadas con HU ni para el reinicio de la replicación tras el tratamiento con este compuesto, incluso cuando ambas nucleasas están ausentes.

DISCUSIÓN

Con el trabajo realizado en esta tesis doctoral hemos intentado contribuir al conocimiento de los mecanismos que las células eucariotas utilizan para preservar la estabilidad del genoma, estudiando diferentes factores implicados en la respuesta celular a la presencia de daño en el DNA durante la replicación cromosómica. En la primera parte de la tesis hemos abordado el estudio de diversas rutas que hacen posible la replicación del genoma y el mantenimiento de la viabilidad celular cuando existen lesiones en el material genético. En la segunda parte de la misma hemos analizado el papel de la endonucleasa Mus81/Mms4 en este proceso. Para todo ello hemos utilizado la levadura *Saccharomyces cerevisiae* como modelo eucariótico de trabajo, y como compuesto causante de lesiones en el DNA hemos empleado el agente alquilante metil metanosulfonato, que se utiliza con frecuencia en los estudios sobre la respuesta celular al daño en el material genético.

1. MÚLTIPLES RUTAS COOPERAN PARA HACER POSIBLE LA REPLICACIÓN CROMOSÓMICA EN PRESENCIA DE DAÑO EN EL MATERIAL GENÉTICO

Cuando las células se someten a la exposición al MMS, que daña el DNA, la fase S es extremadamente larga, y ello es consecuencia de un proceso activo que en *S. cerevisiae* depende de las proteínas quinasas del *checkpoint* Mec1 y Rad53 (Paulovich y Hartwell, 1995). Esta ralentización de la fase S se debe a la inhibición de la activación de los orígenes de replicación “tardíos” por el *checkpoint* y a la progresión lenta de las horquillas de replicación, es decir, a la presencia de un menor número de horquillas que en una fase S normal, que además se desplazan lentamente a través de un DNA dañado (Tercero y Diffley, 2001). Como se ha explicado en la Introducción, el *checkpoint* de la fase S es necesario para mantener la integridad de las horquillas de replicación en estas condiciones, y esto es esencial para la estabilidad del genoma y la viabilidad celular (Tercero y Diffley, 2001; Tercero y col., 2003). No obstante, a pesar de su papel en la estabilización de las horquillas de replicación, el desplazamiento lento de las mismas es independiente de Mec1 y Rad53. Esto es consecuencia probablemente de un impedimento físico para la progresión de las horquillas de replicación, debido a las metilaciones originadas por el MMS y/o a algunos intermediarios que puedan originarse durante el procesamiento de las lesiones.

El movimiento lento de las horquillas a través de un DNA dañado es en cualquier caso un proceso eficiente desde el punto de vista de la finalización de la replicación y de la supervivencia de las células, y no había sido analizado en detalle cuando iniciamos este trabajo. Por esto, quisimos estudiar la contribución que distintas rutas implicadas en las respuesta celular al daño en el DNA, y en concreto en la resistencia al MMS, podrían tener en esta replicación lenta pero eficaz para la viabilidad celular. Para ello, construimos mutantes nulos de los genes que codifican las proteínas involucradas en los primeros pasos de las rutas a estudiar y analizamos en los mismos la progresión de las horquillas de replicación a lo largo de un replicón del cromosoma VI de *S. cerevisiae*, utilizando ensayos de sustitución de isótopos de densidad.

1.1. Las rutas BER, HR y DDT permiten la replicación cromosómica en presencia de lesiones en el DNA originadas por el MMS

Los análisis *in vivo* que hemos realizado han mostrado que las rutas de reparación por escisión de bases (BER), recombinación homóloga (HR) y tolerancia al daño en el DNA (DDT) mediada por Rad6/Rad18 son esenciales para permitir el avance de las horquillas de replicación a través de un DNA dañado por alquilación, así como para el mantenimiento de la viabilidad celular durante este proceso. La ausencia de cualquiera de estas rutas impide la correcta progresión de las horquillas de replicación bajo las condiciones de daño en el material genético ensayadas y conduce a la muerte de las células.

La reparación continua de las bases metiladas por el MMS durante la fase S por la ruta de reparación por escisión de bases (BER), iniciada por la 3 metil-adenina DNA glicosilasa Mag1, se muestra como el principal requerimiento para la eliminación de los obstáculos que interfieren con el avance de las horquillas de replicación en las células tratadas con este compuesto alquilante. En ausencia de la glicosilasa Mag1, y por tanto de la actividad BER, las horquillas de replicación se detienen y quedan bloqueadas, lo cual va acompañado de una caída drástica de la viabilidad celular. Creemos que la parada de las horquillas de replicación en ausencia de Mag1 sugiere firmemente que las lesiones en el DNA ocasionadas por el MMS son las responsables del bloqueo en el avance de las mismas. Si bien se sabía que la N³-metiladenina, el producto de una de las modificaciones provocadas por el MMS y principal responsable de la toxicidad de este, inhibía la síntesis de DNA *in vitro* (Larson y col., 1985), pensamos que el bloqueo *in vivo* de las horquillas de replicación por las metilaciones del MMS no había sido mostrado previamente.

Los resultados obtenidos han indicado también que la recombinación homóloga y la ruta Rad6/Rad18 de tolerancia al daño en el DNA son necesarias para que las horquillas de replicación se desplacen a lo largo de un cromosoma dañado por metilación. La recombinación homóloga podría requerirse para promover el restablecimiento y/o la reactivación de las horquillas una vez que las lesiones primarias hayan sido eliminadas por la ruta BER, dado que se ha propuesto un papel para esta ruta en la recuperación de horquillas bloqueadas o rotas (Lambert y col., 2007; Heyer y col., 2010). A su vez, la recombinación homóloga podría ser necesaria para reparar posibles lesiones secundarias e intermediarios que pudieran formarse al intentar replicar el DNA metilado. Asimismo, las actividades de tolerancia al daño podrían permitir evitar algunas de las lesiones originadas por el MMS que no hayan podido ser reparadas por BER. Esto no se debería simplemente a un posible exceso de daño en el DNA consecuencia de las condiciones experimentales utilizadas, ya que experimentos realizados en nuestro laboratorio y no incluidos en esta tesis han indicado que concentraciones muy bajas de MMS, que no tienen efecto sobre células del tipo silvestre, ocasionan una gran pérdida de viabilidad celular durante la fase S en ausencia de Rad18, aun cuando las rutas de reparación por escisión de bases y de recombinación homóloga están intactas. Tanto la recombinación homóloga como la ruta de tolerancia al daño en el DNA podrían también contribuir a la reparación post-replicativa de algunas lesiones que muy posiblemente quedan por detrás de las horquillas de

replicación, como huecos de DNA de cadena sencilla o pequeñas roturas del DNA (Branzei y Foiani, 2007b; Lambert y col., 2007).

Un aspecto a considerar es el balance entre las funciones de las rutas de recombinación y de tolerancia al daño en las condiciones de replicación cromosómicas analizadas. Los resultados obtenidos indican que ambas rutas son igualmente importantes en el proceso estudiado. Además, los experimentos realizados con el doble mutante *rad52Δrad18Δ*, en el que las dos rutas están eliminadas, han mostrado un efecto sinérgico, o al menos aditivo, con respecto a los mutantes simples. Esto sugiere que ambas rutas contribuyen de forma independiente y se requieren conjuntamente, además de BER, para que las horquillas de replicación puedan progresar a través de un DNA alquilado. No son, por tanto, meras alternativas empleadas por las células cuando intentan replicar sus cromosomas al sufrir daño en su DNA por el tratamiento con MMS.

Los experimentos realizados en todos los mutantes analizados han mostrado también de varias maneras que el *checkpoint* de la fase S está activo en todos ellos cuando las células se exponen al MMS. Por ello, el requerimiento de Mag1, Rad52 y Rad18 en las condiciones ensayadas, y por tanto de las rutas que ellas inician, puede ser atribuido sin ambigüedad a la ausencia de la ruta correspondiente, y no a una respuesta defectuosa del *checkpoint* que daría resultados similares. De estos datos se deduce a su vez que ninguna de estas rutas es necesaria para la activación del *checkpoint* que se produce como consecuencia de las lesiones en el DNA originadas por el MMS. Esta activación requiere necesariamente el establecimiento de las horquillas de replicación (Tercero y col., 2003) y la formación de una estructura que provocaría la señal de inicio para la cascada del *checkpoint*, probablemente DNA de cadena sencilla recubierto de RPA (Zou y Elledge, 2003), para la cual no se necesitaría la actuación de ninguna de las rutas estudiadas. Por último, los resultados obtenidos indican que la ausencia de cualquiera de las rutas analizadas en una fase S normal no es suficiente para provocar la activación del *checkpoint*, ya que esta solo tiene lugar cuando existe daño exógeno.

Las observaciones realizadas al microscopio han mostrado que tanto Mag1 como Rad52 se acumulan en el núcleo durante la fase S en respuesta a la exposición al MMS. Como se ha explicado en los Resultados, no fue posible hacer este tipo de estudios con Rad18. Es posible que la acumulación observada refleje que estas proteínas están formando focos de reparación desde los que podrían ejercer su función, si bien se necesitarían posteriores estudios para confirmar esta posibilidad. La acumulación de ambas proteínas es independiente del *checkpoint* de la fase S, lo que sugiere que aunque las proteínas Mag1 y Rad52 cooperan necesariamente con este para permitir la replicación cromosómica en presencia de DNA alquilado, sin embargo no están reguladas por el mismo, al menos en este proceso.

1.2. Desplazamiento lento de las horquillas de replicación a través de un DNA dañado

Como se ha mencionado anteriormente, la larga duración de la fase S en las células expuestas al MMS es el resultado de la regulación de la actividad de los orígenes de replicación, dependiente del *checkpoint* de la fase S, y del desplazamiento lento de las horquillas de replicación, que es independiente del mismo (Tercero y Diffley, 2001). Los datos obtenidos en esta tesis estarían de acuerdo con la idea de que la ralentización de las horquillas de replicación se debe a la suma de múltiples paradas y bloqueos de las mismas, y no a un modo alternativo de replicación o a un enlentecimiento global del movimiento de las horquillas en presencia de daño en el DNA. Basándonos en las observaciones realizadas, proponemos que las horquillas de replicación que se desplazan a través de un DNA alquilado por el MMS colisionan de forma estocástica con las lesiones en el DNA (las bases metiladas), las cuales detienen o dificultan su progresión normal. Las horquillas son estabilizadas entonces por las proteínas del *checkpoint* de la fase S y pueden superar posteriormente los obstáculos que impiden su movimiento gracias a la cooperación de actividades de reparación del DNA y tolerancia al daño, así como de reinicio y/o restablecimiento de las horquillas. Estos mecanismos necesitan tiempo para funcionar y resolver los problemas, lo que ayudaría a explicar el movimiento lento -pero finalmente eficiente- de las horquillas. Un dibujo esquemático de este proceso se representa en la Figura D1.

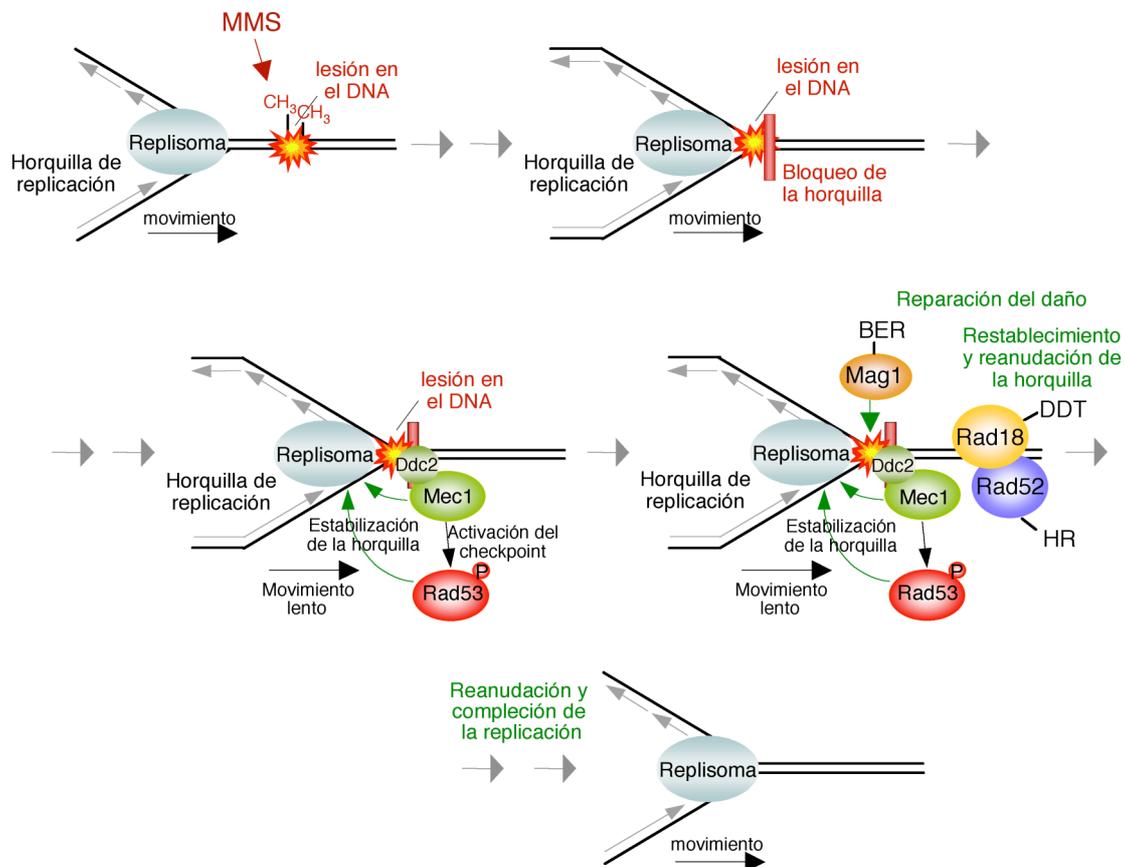


Figura D1. Múltiples rutas cooperan para hacer posible la replicación cromosómica en presencia de daño en el material genético.

1.3. Reversibilidad de los efectos causados por el MMS durante la fase S en células deficientes en BER, HR o DDT

Los defectos en la replicación cromosómica encontrados en los diferentes mutantes van acompañados de una pérdida muy significativa de la supervivencia celular en todos los casos. Si bien se sabía que los mutantes estudiados eran sensibles a la exposición crónica al MMS en placas de cultivo, en este trabajo hemos mostrado la elevada sensibilidad que muestran específicamente durante una única fase S, y podemos asociar por tanto los problemas en la progresión de las horquillas de replicación con la pérdida de viabilidad celular. Un aspecto a estudiar fue si la elevada reducción de la viabilidad tras el tratamiento con MMS en ausencia de las proteínas analizadas podía revertirse, para lo cual se indujo la expresión de cada proteína a estudio después de un tiempo de exposición al agente alquilante. Los experimentos llevados a cabo mostraron que los problemas derivados de la ausencia de Mag1 tras la exposición al MMS durante la fase S pueden revertir con la nueva síntesis de dicha proteína. Los datos obtenidos indicaron que, aunque las horquillas se detienen en presencia de MMS y en ausencia de la reparación por escisión de bases, cuando la expresión de Mag1 se induce las células pueden terminar la fase S gracias a la reanudación de las horquillas bloqueadas, y esto les permite recuperar la viabilidad perdida. Esto solamente es posible si las horquillas detenidas se mantienen íntegras y funcionales, lo que requiere a su vez la actuación de las proteínas del *checkpoint* y de las rutas de recombinación y tolerancia al daño.

Los resultados de los estudios de reversibilidad de la viabilidad celular en los mutantes *rad52Δ* y *rad18Δ* fueron distintos a los obtenidos en el caso del mutante *mag1Δ*. En los primeros, aunque la eliminación del MMS permite la progresión de un número de horquillas suficientes como para detectar nueva síntesis de DNA por citometría de flujo, no se produce una recuperación de la viabilidad celular. A diferencia de Mag1, además, la expresión de la proteína Rad52 no contribuye a la progresión de las horquillas de replicación ni al incremento de la supervivencia celular. Esto sugiere que un número muy importante de horquillas de replicación quedan bloqueadas y colapsan irreversiblemente cuando las células carecen de recombinación homóloga y son expuestas al MMS. Con respecto a Rad18, si esta proteína se induce tras el tratamiento con MMS y la eliminación de la droga, su contribución a la recuperación de la viabilidad es muy modesta. Sin embargo, esta pequeña recuperación podría ser significativa, ya que es bastante repetitiva en diferentes experimentos. Además, un trabajo reciente ha mostrado que la ruta de tolerancia al daño puede desacoplarse de la replicación y que su inducción al final de la fase S permite, al menos parcialmente, que la replicación se lleve a cabo a pesar de los problemas derivados de su ausencia cuando las células son dañadas con MMS (Karras y Jentsch, 2010). No obstante, en estos experimentos se trató a las células con MMS únicamente en la fase G1, y por menos tiempo que en nuestros ensayos.

1.4. Replicación cromosómica en presencia de otros agentes causantes de daño exógeno en el DNA

Otros agentes que causan daño en el DNA parecen afectar a la replicación cromosómica de forma distinta al MMS. Por ejemplo, se ha descrito que las radiaciones ionizantes ralentizan la fase S debido a bloqueos transitorios de la activación de los orígenes de replicación, pero no tienen un efecto aparente sobre el movimiento de las horquillas (Merrick y col., 2004). Otro estudio ha mostrado que ni la recombinación homóloga ni la síntesis a través de lesiones, ausentes respectivamente en los mutantes *rad52Δ* y *rad18Δ*, afectan a la progresión de las horquillas de replicación en presencia de daño irreparable en el DNA ocasionado por la luz ultravioleta (Lopes y col., 2006). No obstante, la replicación está claramente afectada en estos mutantes bajo estas condiciones, puesto que el número de huecos de DNA sin replicar se incrementa notablemente en los mismos. Sin duda, los diferentes requerimientos para la progresión de las horquillas de replicación a través de un DNA dañado son esperables, ya que la diversa naturaleza de las lesiones ocasiona probablemente diferentes tipos de bloqueos e impedimentos para la replicación y distintas estructuras e intermediarios en las horquillas bloqueadas. A modo de ejemplo, a diferencia del daño irreparable provocado por la luz UV, el MMS no origina un incremento muy significativo del DNA de cadena sencilla en las horquillas de replicación (Lopes y col., 2006).

2. LA NUCLEASA Mus81-Mms4 PERMITE QUE LAS CÉLULAS COMPLETEN LA REPLICACIÓN CROMOSÓMICA Y MANTENGAN LA ESTABILIDAD DEL GENOMA CUANDO EL DNA ESTÁ DAÑADO

Como se ha explicado en la Introducción, la nucleasa heterodimérica Mus81-Mms4 está implicada en el mantenimiento de la estabilidad del genoma cuando el DNA está dañado por agentes como el MMS o la luz ultravioleta. Los estudios realizados *in vitro* por diferentes grupos han mostrado que tiene actividad nucleasa sobre estructuras ramificadas que se asemejan a horquillas de replicación, así como sobre *D-loops*, *3'-flaps*, pseudo-uniones de Holliday y otros posibles intermediarios de recombinación (Kaliraman y col., 2001; Whitby y col., 2003; Fricke y col., 2005; Ehmsen y Heyer, 2008). Teniendo en cuenta estos datos, se han propuesto dos posibles papeles para este complejo *in vivo*, que no son mutuamente excluyentes: Mus81-Mms4 estaría implicada en el procesamiento de intermediarios de recombinación resultantes de la reparación de horquillas de reparación dañadas y/o en la rotura de horquillas de replicación paradas o bloqueadas para iniciar la recombinación homóloga (Osman y Whitby, 2007; Ciccia y col., 2008). A pesar de todo ello, no obstante, cuando se inició este trabajo no se conocían en detalle la función o funciones de Mus81-Mms4 *in vivo* ni los sustratos fisiológicos de esta endonucleasa durante un ciclo mitótico.

2.1. Mus81-Mms4 es necesaria para mantener la viabilidad celular en respuesta al daño en el DNA durante la fase S

Para contribuir al conocimiento de la función celular de la nucleasa Mus81-Mms4 de *S. cerevisiae*, nos planteamos analizar el papel de la misma durante la fase S, en condiciones que perturban la replicación cromosómica. Para ello, utilizamos

mutantes de delección de los genes que codifican las subunidades catalítica y reguladora del complejo, *mus81Δ* y *mms4Δ* respectivamente, así como un doble mutante *mus81Δmms4Δ*. Los estudios realizados indicaron que la ausencia de una o de ambas subunidades de esta endonucleasa no ocasiona diferencias significativas apreciables con respecto al tipo silvestre en cuanto a la progresión de las células en la fase S en presencia de MMS en el medio. Sin embargo, sí provoca una importante pérdida de viabilidad celular en estas condiciones. Esto sugiere que, a pesar de que la fase S es aparentemente normal en ausencia de esta nucleasa y que, por tanto, la mayor parte de la replicación del DNA se lleva a cabo, la replicación cromosómica podría ser defectiva o incompleta. Los resultados obtenidos indican también que la ausencia de cualquiera de las dos subunidades del complejo, o de ambas, tiene las mismas consecuencias para la células, de lo que se deduce que tanto la subunidad catalítica como la reguladora son igualmente necesarias para la actividad nucleasa del complejo.

Los experimentos realizados han mostrado a su vez que el *checkpoint* de la fase S se encuentra activo y funcional en ausencia de Mus81 en las condiciones experimentales ensayadas en esta tesis. De ello puede deducirse que los efectos observados son atribuibles a la ausencia de Mus81 y no a un *checkpoint* defectivo que daría un resultado similar y, además, que esta endonucleasa no es necesaria para generar la señal que activa el *checkpoint*. Asimismo, dado que Rad53 no se activa en el mutante *mus81Δ* cuando no hay un agente exógeno que cause daño en el DNA, esto quiere decir que la ausencia de la endonucleasa no crea problemas en una fase S normal que requieran la actuación del *checkpoint* de la fase S.

2.2. Mus81-Mms4 contribuye a hacer posible la replicación cromosómica en condiciones de daño en el DNA

Los análisis realizados en este trabajo han mostrado que, efectivamente, cuando no está presente la nucleasa Mus81-Mms4, la replicación cromosómica en condiciones de daño en el DNA es defectuosa y no se completa, lo que causaría la gran pérdida de viabilidad encontrada. Los experimentos de electroforesis de geles bidimensionales han indicado que las horquillas de replicación se forman de manera similar en las células mutantes *mus81Δ* y en las células del tipo silvestre, a pesar de la exposición al MMS, y que la replicación se inicia sin aparentes problemas en ambas. Sin embargo, los ensayos de sustitución de isótopos de densidad llevados a cabo, que permiten estimar cuantitativamente la elongación de la replicación, han mostrado que, si bien las horquillas inician la replicación de forma similar tanto en ausencia como en presencia de Mus81, la progresión de las horquillas está afectada en el mutante *mus81Δ* cuando el DNA está dañado por el MMS, resultando una replicación defectuosa del cromosoma analizado con respecto a las células del tipo silvestre. Además, los experimentos de electroforesis de campo pulsado han indicado que, en el conjunto del genoma, y de acuerdo con los resultados obtenidos en un único cromosoma mediante sustitución de isótopos de densidad, la replicación de la mayoría de los cromosomas no se completa cuando las células se dañan por acción del MMS en ausencia de Mus81-Mms4. Estos últimos resultados coinciden con un trabajo reciente (Ho y col., 2010), donde se muestra un defecto del mutante *mus81Δ* en el restablecimiento de la replicación tras un tratamiento de las células con MMS. Todos estos datos en conjunto indican que la

nucleasa Mus81-Mms4 de *S. cerevisiae* es necesaria para poder completar la replicación cromosómica cuando el DNA está dañado.

A diferencia de los resultados obtenidos tras el tratamiento de las células con MMS, hemos encontrado que Mus81-Mms4 no tiene un papel en el restablecimiento de la replicación cuando las horquillas se bloquean como consecuencia de la disminución de los niveles de dNTPs por la acción de la hidroxurea. Estos resultados están aparentemente en contradicción con lo propuesto para células de mamíferos, donde la recuperación de las horquillas paradas tras un tratamiento con hidroxurea está reducida en células *Mus81*^{-/-} ES de ratón (74% de recuperación en células silvestres frente a un 47% de recuperación en células mutantes) (Hanada y col., 2007). Estos autores proponen que Mus81 actuaría generando roturas de DNA de doble cadena (DSBs) cuando las horquillas de replicación están bloqueadas tras la exposición a la hidroxurea, permitiendo así el restablecimiento de la replicación. No obstante, en el mismo trabajo se muestran defectos en la replicación en células deficientes en Mus81, aun en ausencia de perturbaciones externas. Los diferentes resultados encontrados indicarían que la respuesta celular a la parada o bloqueo de las horquillas de replicación debida al estrés replicativo es distinta en levaduras y en las células de mamífero empleadas en el estudio citado. Esta diferente respuesta a las perturbaciones durante la replicación no resultaría extraña, no obstante, dado que, por ejemplo, a diferencia de las levaduras carentes de Mus81-Mms4, las células ES de ratón deficientes en Mus81 no son sensibles a la exposición a la luz UV o al MMS (Hanada y col., 2007). En otro estudio realizado con células humanas, se ha mostrado que Mus81 también genera roturas de DNA de doble cadena necesarias para el restablecimiento de la replicación tras un tratamiento con HU, aun a expensas de la estabilidad del genoma (Franchitto y col., 2008). Sin embargo, esta función únicamente tiene lugar en situaciones patológicas, dado que estos autores solo la encontraron en células con síndrome de Werner, deficientes en la enzima del tipo RecQ WRN (Franchitto y col., 2008).

2.3. Función de Mus81-Mms4

Las diferencias encontradas para Mus81-Mms4 de *S. cerevisiae* en cuanto a su requerimiento para completar la replicación cromosómica en condiciones de daño en el DNA o en situaciones de estrés replicativo permiten proponer algunos aspectos sobre su modo de acción *in vivo*. Así, los resultados obtenidos sugieren que, al menos en *S. cerevisiae* y en situaciones no patológicas, la nucleasa Mus81-Mms4 no se requiere para realizar una rotura en las horquillas bloqueadas que permita el inicio de la recombinación y el restablecimiento de la replicación una vez solucionado el problema que origina la parada de la horquilla –una de las dos opciones mencionadas al comienzo de este apartado-. De ser así, sería esperable su requerimiento para restablecer la replicación cromosómica tanto cuando las células son expuestas al MMS como cuando son tratadas con hidroxurea, dado que en ambos casos las horquillas se bloquean, y sin embargo únicamente es necesaria en el primer caso. Asimismo, si en ausencia de Mus81-Mms4 se produjera un defecto en el inicio de la recombinación en las células tratadas con MMS, sería esperable encontrar algún problema en la formación de los intermediarios de recombinación en los experimentos de geles bidimensionales, que no hemos observado. Por el contrario, el requerimiento para completar la replicación

cromosómica en presencia de lesiones en el DNA -y no en el caso del estrés replicativo- sí apoya fuertemente que Mus81-Mms4 sea necesaria para el procesamiento de intermediarios de recombinación o de otros que resulten de la reparación del daño en el DNA, así como de estructuras aberrantes que pudieran resultar de la colisión de la horquilla con una lesión. Un esquema ilustrando el requerimiento de Mus81-Mms4 en el procesamiento de intermediarios para que la replicación del genoma pueda finalizarse se representa en la Fig. D2.

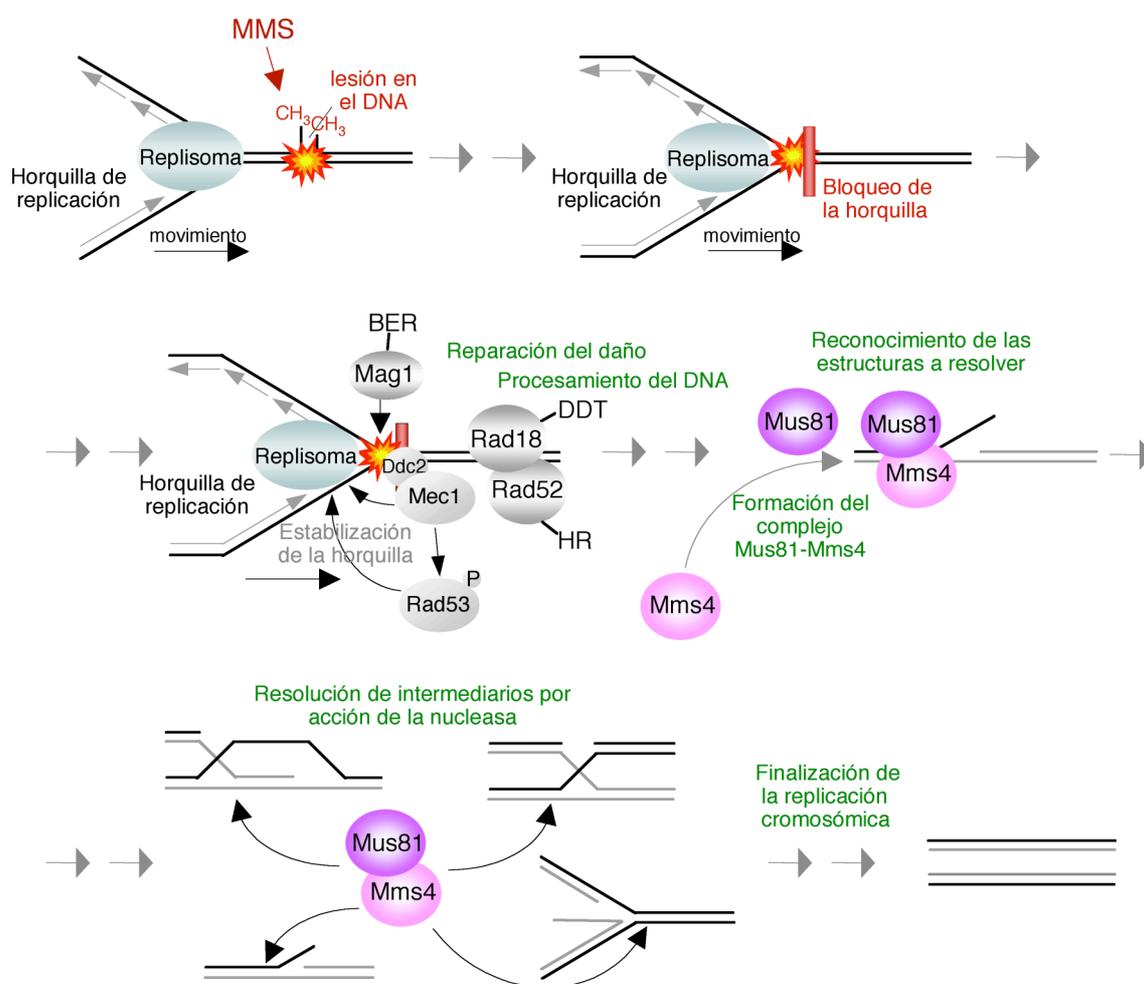


Figura D2. La nucleasa Mus81-Mms4 permite que las células completen la replicación cromosómica cuando el DNA está dañado.

Los datos obtenidos en esta tesis indican que la recombinación homóloga es necesaria para que la replicación cromosómica pueda llevarse a cabo en presencia de lesiones en el material genético ocasionadas por el MMS, y los intermediarios generados deberían ser resueltos para que la replicación pueda completarse. En esta resolución intervendría Mus81. Asimismo, en la primera parte de la tesis se ha mostrado también que los mecanismos de tolerancia al daño en el DNA son importantes para la respuesta al daño en el DNA durante la fase S. Uno de estos mecanismos sería el cambio de molde (*template switching*), que generaría intermediarios que deberían resolverse, proceso en el que podría intervenir Mus81. Por el contrario, el restablecimiento de la replicación después del tratamiento con hidroximetilurea, que no

provoca daño en el DNA *per se*, no necesita la recombinación homóloga, al menos en *S. cerevisiae* (Diffley y col., 2000). Asimismo, experimentos realizados en nuestro laboratorio han indicado que Rad18, y por tanto la ruta de tolerancia al daño que esta proteína inicia, no es necesaria tampoco para restablecer la replicación en *S. cerevisiae* después del bloqueo de las horquillas de replicación con hidroxurea. Por tanto, en una situación de estrés replicativo originada por la reducción de los niveles de dNTPs no se generarían intermediarios del mismo tipo que en el caso de la exposición al MMS, al menos en situaciones no patológicas, y la nucleasa Mus81-Mms4 no sería necesaria.

2.4. Reversibilidad de los efectos causados por el MMS en ausencia de Mus81-Mms4 y posible regulación de esta endonucleasa

Los resultados obtenidos han mostrado que las células pueden recuperar en gran medida la viabilidad perdida tras la exposición al MMS en ausencia de Mus81-Mms4 si las dos subunidades son expresadas de nuevo antes de que las células sean sembradas en placa. Por tanto, las consecuencias del tratamiento con MMS en células carentes de la nucleasa, que impiden que la replicación cromosómica se complete debido probablemente a la presencia de intermediarios sin procesar, son reversibles por la inducción del complejo y no representan una situación terminal para la célula.

En estos experimentos hemos encontrado a su vez que la recuperación de la viabilidad solo empieza a observarse cuando las células llegan al final de la fase S. Es decir, esta se produce cuando la mayor parte de la replicación del genoma ha tenido lugar, a pesar de que la expresión de Mus81-Mms4 se haya realizado horas antes. Además, si la expresión de este complejo se induce cuando las células ya están al final de la fase S, la recuperación de la viabilidad se produce de forma similar al caso anterior. Estos resultados pueden tener importantes consecuencias para entender cómo funciona Mus81-Mms4, ya que indican que, al menos en las condiciones experimentales ensayadas, esta endonucleasa actúa después de que la mayor parte de la replicación cromosómica se haya llevado a cabo. Estos datos sugieren que Mus81-Mms4 podría funcionar de forma separada a la replicación del genoma, resolviendo al final de la fase S intermediarios generados durante la misma como consecuencia del daño en el DNA, y permitiendo así que la replicación del genoma se complete y las células mantengan la viabilidad. De ser así, el momento de actuación de esta endonucleasa sería teóricamente beneficioso para las células, ya que evitaría que Mus81-Mms4 pudiese reconocer y procesar nucleolíticamente diferentes intermediarios durante la fase S, incluyendo horquillas de replicación, situación que podría provocar reordenamientos cromosómicos e inestabilidad genómica. Su actuación quedaría restringida al final de la misma, cuando eliminaría los intermediarios que no se resolvieran por otras rutas durante el proceso de replicación. Esto podría ser aplicable tanto a situaciones de lesiones en el DNA originadas por daño endógeno como a situaciones provocadas por agentes exógenos.

Un trabajo realizado en nuestro laboratorio ha mostrado que en un ciclo celular normal, en ausencia de daño exógeno, la función nucleasa del complejo Mus81-Mms4 está regulada por fosforilación de la subunidad no catalítica Mms4. Los resultados obtenidos indicaron que la activación de Mus81-Mms4 por modificación de Mms4 solo

ocurre al final de la fase S, y depende de las quinasas Cdc28 (CDK) y Cdc5 (quinasa del tipo Polo) (Gallo-Fernandez y col., 2012). Un trabajo reciente también ha mostrado que la actividad nucleasa de Mus81-Mms4 está controlada por fosforilación de Mms4, tanto en meiosis como en mitosis (Matos y col., 2011). Dado que la fosforilación de la subunidad no catalítica solo ocurre cuando las células han realizado la mayor parte de la replicación cromosómica, al menos en ausencia de daño en el DNA inducido por agentes exógenos, y la misma es necesaria para la actividad nucleasa del complejo, esta regulación podría explicar los resultados de recuperación de la viabilidad tras el tratamiento con MMS explicados anteriormente.

Con respecto a otros aspectos de la posible regulación de Mus81-Mms4, los experimentos realizados sugieren que la actividad del complejo podría estar modulada mediante la unión de la subunidad reguladora Mms4 a la cromatina cuando existe daño en el DNA. Si bien se necesitan más análisis para validar estos resultados, el hecho de que en nuestros ensayos la fracción cromatínica esté únicamente enriquecida en Mms4 cuando las células son tratadas con MMS, y no en una fase S normal, sugiere que esta subunidad podría reconocer solamente el DNA dañado. Esta unión de Mms4 a la cromatina podría permitir la formación y activación del complejo Mus81-Mms4, que no obstante, según lo explicado anteriormente, sería únicamente funcional al final de la fase S. El análisis de la estructura del complejo MUS81-EME1 humano permitió proponer a los autores un posible papel de EME1, la subunidad homóloga a Mms4, como plataforma estable para la interacción de MUS81-EME1 y sus sustratos en el DNA (Chang y col., 2008), y pensamos que esta idea podría también extenderse a Mus81-Mms4 de *S. cerevisiae*.

El análisis de Mus81 y Mms4 por inmunoblot no ha revelado modificaciones detectables de estas subunidades en respuesta a la exposición al MMS o a la hidroxurea durante la fase S. Si bien es posible que estas modificaciones existan y no hayamos podido identificarlas, los resultados contrastan en principio con lo publicado por Ehmsen y Heyer (2008), quienes han mostrado que Mus81 de *S. cerevisiae* está fosforilada cuando se purifica a partir de células tratadas con MMS. Aunque necesitaremos análisis adicionales, la concentración de esta droga utilizada en sus experimentos es tres veces mayor que en los nuestros y, además, el tratamiento con MMS se realizó en cultivos asincrónicos, por lo que no son datos completamente comparables. No obstante, con respecto a Mms4, como ya se ha mencionado anteriormente, esta subunidad se fosforila en un ciclo normal solamente al final de la fase S (Gallo-Fernández y col., 2012; Matos y col., 2011), y el tratamiento con MMS realizado en nuestros experimentos podría impedir que las células llegaran al punto del ciclo donde la proteína se modifica.

Por otra parte, en *S. pombe*, Mus81 se fosforila de forma dependiente de Cds1 (proteína homóloga a Rad53) en células tratadas con HU (Boddy y col., 2000; Kai y col., 2005), lo que tiene importantes consecuencias para su regulación, ya que esta modificación provoca su desplazamiento de la cromatina. En *S. pombe*, Cds1 evita teóricamente de esta manera que Mus81 pueda realizar cortes en las horquillas de replicación bloqueadas (Kai y col., 2005). Con respecto a Mus81 de *S. cerevisiae*, no parece extraño haber encontrado que no se encuentra fosforilada en células tratadas con

HU, ya que en esta levadura Rad53 parece actuar únicamente sobre la nucleasa Exo1, impidiendo su acción (Segurado y Diffley, 2008). En concordancia con esto, los resultados que hemos obtenido sugieren que el *checkpoint* de la fase S no regula a Mus81/Mms4 en *S. cerevisiae*.

2.5. Cooperación de Mus81-Mms4 y de la resolvasa Yen1 en la respuesta celular al daño en el DNA durante la fase S

En esta tesis hemos encontrado también que Mus81-Mms4 y la resolvasa Yen1 cooperan de algún modo para hacer frente al daño en el DNA originado por el MMS durante la fase S. Se ha mostrado recientemente que las células de *S. cerevisiae* carentes de ambas nucleasas son más sensibles al tratamiento en placa con este compuesto que los mutantes individuales de las mismas (Blanco y col., 2010). De acuerdo con ello, los experimentos que hemos realizado indican que este incremento de la sensibilidad al MMS se manifiesta también de forma importante cuando se replica el material genético.

Como podía deducirse de los datos publicados sobre crecimiento crónico en placa (Blanco y col., 2010), nuestros resultados indican que las células mutantes *yen1Δ* no son prácticamente sensibles al MMS cuando replican su DNA. Puesto que la sensibilidad de los mutantes *mus81Δ* a este compuesto durante la fase S se incrementa sin embargo notablemente en ausencia de Yen1, todo ello sugiere que esta resolvasa suplente al menos algunas de las funciones de Mus81 cuando esta última no está presente. Este fenotipo puede sin duda sugerir que ambas proteínas tienen funciones redundantes en la respuesta celular al daño en el DNA durante la replicación cromosómica, lo que implicaría en principio que ambas nucleasas serían capaces de procesar el mismo tipo de sustratos. De hecho, en *S. cerevisiae*, la sobreexpresión de Yen1 rescata parcialmente la sensibilidad al MMS en placa de las células *mus81Δ* (Blanco y col., 2010). Asimismo, la expresión de la proteína GEN1 humana en *S. pombe* –organismo que carece de ortólogos de *GEN1/YEN1*– rescata la hipersensibilidad de las células *mus81Δ* a agentes causantes de daño en el DNA como el MMS o la camptotecina (Lorenz y col., 2010). No obstante, un artículo reciente ha indicado que Yen1 y Mus81-Mms4 no pueden intercambiar fácilmente sus sustratos de acción, al menos durante la reparación de DSB mediante recombinación entre cromátidas hermanas, a no ser que estas proteínas sean sobreexpresadas (Muñoz-Galván y col., 2012). Además, como comentan Schwartz y Heyer (2011), no está claro en cualquier caso si las dos nucleasas tienen realmente los mismos sustratos *in vivo* –o al menos comparten algunos de ellos–, o si Yen1 rompe estructuras patológicas que se acumulan en los mutantes *mus81* debido al procesamiento del sustrato original de Mus81-Mms4. Como señalan estos autores, la falta de conocimiento preciso sobre los sustratos *in vivo* de Mus81-Mms4 complica aún más cualquier interpretación sobre los potenciales sustratos *in vivo* de Yen1.

El análisis que hemos realizado sobre las consecuencias del tratamiento con hidroximetilurea durante una única fase S en células carentes de Mus81-Mms4 y Yen1 ha indicado también que, a diferencia de cuando existe daño en el DNA, la ausencia de ambas nucleasas no tiene un efecto significativo sobre la capacidad de las células para restablecer la replicación en respuesta al estrés replicativo. A pesar de que la sensibilidad de un doble mutante *mus81Δyen1Δ* al tratamiento crónico de HU en placa

es mayor que la de los mutantes individuales (Blanco y col., 2010), los cuales son muy poco sensibles, nuestros experimentos muestran que estas células pueden continuar replicando su DNA tras la exposición a la hidroximetilurea, sin que queden horquillas bloqueadas y sin sufrir una pérdida significativa de viabilidad. Esto está de acuerdo con el hecho de que Mus81-Mms4 no sea necesaria para restablecer la actividad de las horquillas de replicación tras la disminución de los niveles de dNTPs por la acción de la hidroximetilurea, puesto que Yen1 no tendría ninguna función que suplir en este caso en ausencia de Mus81.

3. CONSIDERACIONES FINALES

Además de las rutas y proteínas que hemos estudiado en esta tesis, otras contribuyen a que la replicación del genoma se complete de forma satisfactoria en cada ciclo celular a pesar de las perturbaciones que puedan existir. Las células de distintos organismos deficientes en algunos procesos muestran defectos en la progresión en la fase S cuando tienen dañado su DNA, y sería desde luego interesante analizar si las proteínas correspondientes contribuyen a hacer posible la estabilidad y el desplazamiento de las horquillas de replicación bajo esas condiciones. A pesar de las aportaciones de numerosos grupos, que han supuesto un gran avance en el campo de trabajo, necesitamos todavía comprender cómo las rutas que cooperan para permitir que las células repliquen un DNA dañado están coordinadas entre ellas, con la maquinaria de replicación y con los componentes del *checkpoint* de la fase S, y cómo esta necesaria coordinación hace posible el mantenimiento de la estabilidad del genoma. Es importante considerar que muchos fármacos utilizados en quimioterapia actúan dañando el DNA y/o interfiriendo con la replicación cromosómica, y algunos agentes alquilantes se encuentran entre las drogas antitumorales más antiguas que todavía están en uso para el tratamiento de algunos tipos de cáncer. Pensamos que el conocimiento de los procesos implicados en la respuesta celular a las lesiones en el material genético durante la replicación de los cromosomas puede contribuir a la comprensión de algunos aspectos de la biología de las células tumorales y a la futura evolución y desarrollo de drogas para uso en terapias contra el cáncer.

CONCLUSIONES

1. Las rutas de reparación por escisión de bases (BER), recombinación homóloga (HR) y tolerancia al daño en el DNA (DDT) de *S. cerevisiae* son esenciales para que las células lleven a cabo la replicación cromosómica en presencia de lesiones en el material genético originadas por el MMS. La ausencia de cualquiera de ellas impide la correcta progresión de las horquillas de replicación bajo estas condiciones y ocasiona la muerte celular.
2. El *checkpoint* de la fase S es funcional en células carentes de las rutas BER, HR y DDT. Por lo tanto, los defectos en la progresión y estabilidad de las horquillas de replicación encontrados en los mutantes de las mismas cuando son tratados con MMS no se deben a un *checkpoint* defectivo. De ello se deduce también que ninguna de estas rutas es necesaria para originar la señal que activa el *checkpoint* de la fase S. Asimismo, la falta de estas rutas no provoca la activación de este mecanismo de vigilancia, ya que esta solo se produce en presencia de lesiones en el DNA.
3. Los efectos producidos por el MMS sobre la viabilidad celular en células que carecen de la glicosilasa Mag1, que inicia BER, son reversibles mediante la nueva síntesis de esta proteína. Sin embargo, estos efectos son irreversibles en células carentes de recombinación homóloga, a pesar de la nueva expresión de Rad52, y solo reversibles en pequeña proporción en el caso de la ausencia de DDT.
4. Las proteínas Mag1 y Rad52 se acumulan durante la fase S cuando las células se exponen al MMS, formando posiblemente focos desde los que ejercerían su función.
5. La nucleasa Mus81-Mms4 de *S. cerevisiae* es necesaria para el mantenimiento de la viabilidad celular cuando las células son expuestas al MMS durante la fase S, haciendo posible que la replicación cromosómica se complete bajo estas condiciones de daño en el DNA.
6. Las consecuencias del tratamiento con MMS para la viabilidad celular en ausencia de Mus81-Mms4 son en gran parte reversibles mediante la nueva expresión de ambas subunidades del complejo, por lo que no representan una situación terminal para la célula.
7. Mus81-Mms4 puede actuar después de que la mayor parte de la replicación cromosómica haya tenido lugar y, si bien es necesaria para que esta se complete cuando existe daño en el DNA, puede funcionar por tanto desacoplada de la misma.
8. Mus81-Mms4 no se requiere para restablecer la replicación cuando las horquillas se bloquean como consecuencia del estrés replicativo provocado por la hidroximetilurea. Sin embargo, sí es necesaria para completar la replicación cromosómica en presencia de daño en el DNA originado por el MMS, que provoca también el bloqueo de las horquillas. En conjunto, estos resultados sugieren que, al menos en *S. cerevisiae*, Mus81-Mms4 se necesitaría para resolver los intermediarios generados durante la reparación de las lesiones, y no para realizar el corte en el DNA que facilitaría el inicio de la recombinación y el restablecimiento de la replicación desde la horquilla bloqueada, como había sido sugerido.

9. La actividad del complejo Mus81-Mms4 podría estar regulada por la unión de la subunidad reguladora Mms4 a la cromatina cuando existen lesiones en el DNA.

10. Mus81-Mms4 y la resolvasa Yen1 cooperan en la respuesta celular al daño en el DNA durante la fase S.

REFERENCIAS

- Admire A, Shanks L, Danzl N, Wang M, Weier U, Stevens W, Hunt E, Weinert T (2006) Cycles of chromosome instability are associated with a fragile site and are increased by defects in DNA replication and checkpoint controls in yeast. *Genes Dev* **20**: 159-173
- Aguilera A, Gomez-Gonzalez B (2008) Genome instability: a mechanistic view of its causes and consequences. *Nat Rev Genet* **9**: 204-217
- Alcasabas AA, Osborn AJ, Bachant J, Hu F, Werler PJ, Bousset K, Furuya K, Diffley JFX, Carr AM, Elledge SJ (2001) Mrc1 transduces signals of DNA replication stress to activate Rad53. *Nat Cell Biol* **3**: 958-965
- Allen JB, Zhou Z, Siede W, Friedberg EC, Elledge SJ (1994) The SAD1/RAD53 protein kinase controls multiple checkpoints and DNA damage-induced transcription in yeast. *Genes Dev* **8**: 2401-2415
- Anders MW, Dekant W (1994) Conjugation-dependent carcinogenicity and toxicity of foreign compounds. *Adv Pharmacol* **27**: 1-519
- Aparicio OM, Weinstein DM, Bell SP (1997) Components and dynamics of DNA replication complexes in *S. cerevisiae*: redistribution of MCM complexes and Cdc45p during S phase. *Cell* **91**: 59-69
- Aucher W, Becker E, Ma E, Miron S, Martel A, Ochsenbein F, Marsolier-Kergoat MC, Guerois R (2010) A strategy for interaction site prediction between phospho-binding modules and their partners identified from proteomic data. *Mol Cell Proteomics* **9**: 2745-2759
- Bastin-Shanower SA, Fricke WM, Mullen JR, Brill SJ (2003) The mechanism of Mus81-Mms4 cleavage site selection distinguishes it from the homologous endonuclease Rad1-Rad10. *Mol Cell Biol* **23**: 3487-3496
- Bell SP, Dutta A (2002) DNA Replication in Eukaryotic Cells. *Annu Rev Biochem* **71**: 333-374
- Bell SP, Kobayashi R, Stillman B (1993) Yeast origin recognition complex functions in transcription silencing and DNA replication. *Science* **262**: 1844-1849
- Bell SP, Stillman B (1992) ATP-dependent recognition of eukaryotic origins of DNA replication by a multiprotein complex. *Nature* **357**: 128-134
- Beranek DT (1990) Distribution of methyl and ethyl adducts following alkylation with monofunctional alkylating agents. *Mutat Res* **231**: 11-30
- Bielinsky AK, Gerbi SA (2001) Where it all starts: eukaryotic origins of DNA replication. *J Cell Sci* **114**: 643-651
- Bjelland S, Seeberg E (2003) Mutagenicity, toxicity and repair of DNA base damage induced by oxidation. *Mutat Res* **531**: 37-80
- Blanco MG, Matos J, Rass U, Ip SC, West SC (2010) Functional overlap between the structure-specific nucleases Yen1 and Mus81-Mms4 for DNA-damage repair in *S. cerevisiae*. *DNA Repair (Amst)* **9**: 394-402
- Blastyak A, Pinter L, Unk I, Prakash L, Prakash S, Haracska L (2007) Yeast Rad5 protein required for postreplication repair has a DNA helicase activity specific for replication fork regression. *Mol Cell* **28**: 167-175
- Blow JJ, Hodgson B (2002) Replication licensing--defining the proliferative state? *Trends Cell Biol* **12**: 72-78
- Boddy MN, Gaillard PH, McDonald WH, Shanahan P, Yates JR, 3rd, Russell P (2001) Mus81-Eme1 are essential components of a Holliday junction resolvase. *Cell* **107**: 537-548

- Boddy MN, Lopez-Girona A, Shanahan P, Interthal H, Heyer WD, Russell P (2000) Damage tolerance protein Mus81 associates with the FHA1 domain of checkpoint kinase Cds1. *Mol Cell Biol* **20**: 8758-8766
- Boiteux S, Guillet M (2004) Abasic sites in DNA: repair and biological consequences in *Saccharomyces cerevisiae*. *DNA Repair (Amst)* **3**: 1-12
- Branzei D, Foiani M (2007a) Interplay of replication checkpoints and repair proteins at stalled replication forks. *DNA Repair (Amst)* **6**: 994-1003
- Branzei D, Foiani M (2007b) Template switching: from replication fork repair to genome rearrangements. *Cell* **131**: 1228-1230
- Branzei D, Foiani M (2008) Regulation of DNA repair throughout the cell cycle. *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**: 297-308
- Branzei D, Foiani M (2010) Maintaining genome stability at the replication fork. *Nat Rev Mol Cell Biol* **11**: 208-219
- Brown EJ, Baltimore D (2000) ATR disruption leads to chromosomal fragmentation and early embryonic lethality. *Genes Dev* **14**: 397-402
- Bryant JA, Aves SJ (2011) Initiation of DNA replication: functional and evolutionary aspects. *Ann Bot* **107**: 1119-1126
- Burgers PM (2009) Polymerase dynamics at the eukaryotic DNA replication fork. *J Biol Chem* **284**: 4041-4045
- Calzada A, Hodgson B, Kanemaki M, Bueno A, Labib K (2005) Molecular anatomy and regulation of a stable replisome at a paused eukaryotic DNA replication fork. *Genes Dev* **19**: 1905-1919
- Casper AM, Nghiem P, Arlt MF, Glover TW (2002) ATR regulates fragile site stability. *Cell* **111**: 779-789
- Cayrou C, Coulombe P, Mechali M (2010) Programming DNA replication origins and chromosome organization. *Chromosome Res* **18**: 137-145
- Cha RS, Kleckner N (2002) ATR homolog Mec1 promotes fork progression, thus averting breaks in replication slow zones. *Science* **297**: 602-606
- Chang JH, Kim JJ, Choi JM, Lee JH, Cho Y (2008) Crystal structure of the Mus81-Eme1 complex. *Genes Dev* **22**: 1093-1106
- Chang M, Bellaoui M, Zhang C, Desai R, Morozov P, Delgado-Cruzata L, Rothstein R, Freyer GA, Boone C, Brown GW (2005) RMI1/NCE4, a suppressor of genome instability, encodes a member of the RecQ helicase/Topo III complex. *EMBO J* **24**: 2024-2033
- Chen J, Derfler B, Samson L (1990) *Saccharomyces cerevisiae* 3-methyladenine DNA glycosylase has homology to the AlkA glycosylase of *E. coli* and is induced in response to DNA alkylation damage. *EMBO J* **9**: 4569-4575.
- Chiu RK, Brun J, Ramaekers C, Theys J, Weng L, Lambin P, Gray DA, Wouters BG (2006) Lysine 63-polyubiquitination guards against translesion synthesis-induced mutations. *PLoS Genet* **2**: e116
- Ciccica A, Constantinou A, West SC (2003) Identification and characterization of the human mus81-eme1 endonuclease. *J Biol Chem* **278**: 25172-25178
- Ciccica A, McDonald N, West SC (2008) Structural and functional relationships of the XPF/MUS81 family of proteins. *Annu Rev Biochem* **77**: 259-287

- Cobb JA, Bjergbaek L, Shimada K, Frei C, Gasser SM (2003) DNA polymerase stabilization at stalled replication forks requires Mec1 and the RecQ helicase Sgs1. *EMBO J* **22**: 4325-4336
- Cobb JA, Schleker T, Rojas V, Bjergbaek L, Tercero JA, Gasser SM (2005) Replisome instability, fork collapse, and gross chromosomal rearrangements arise synergistically from Mec1 kinase and RecQ helicase mutations. *Genes Dev* **19**: 3055-3069
- Cocker JH, Piatti S, Santocanale C, Nasmyth K, Diffley JFX (1996) An essential role for the Cdc6 protein in forming the pre-replicative complexes of budding yeast. *Nature* **379**: 180-182
- Cook JS (1970) Photoreactivation in animal cells. *Photophysiology* **5**: 191-233
- Costa RM, Chigancas V, Galhardo Rda S, Carvalho H, Menck CF (2003) The eukaryotic nucleotide excision repair pathway. *Biochimie* **85**: 1083-1099
- Cotta-Ramusino C, Fachinetti D, Lucca C, Doksan Y, Lopes M, Sogo J, Foiani M (2005) Exo1 processes stalled replication forks and counteracts fork reversal in checkpoint-defective cells. *Mol Cell* **17**: 153-159
- Daley JM, Palmbo PL, Wu D, Wilson TE (2005) Nonhomologous end joining in yeast. *Annu Rev Genet* **39**: 431-451
- de Laat WL, Jaspers NG, Hoeijmakers JH (1999) Molecular mechanism of nucleotide excision repair. *Genes Dev* **13**: 768-785
- de los Santos T, Hunter N, Lee C, Larkin B, Loidl J, Hollingsworth NM (2003) The Mus81/Mms4 endonuclease acts independently of double-Holliday junction resolution to promote a distinct subset of crossovers during meiosis in budding yeast. *Genetics* **164**: 81-94
- Dendouga N, Gao H, Moechars D, Janicot M, Vialard J, McGowan CH (2005) Disruption of murine Mus81 increases genomic instability and DNA damage sensitivity but does not promote tumorigenesis. *Mol Cell Biol* **25**: 7569-7579
- Desany BA, Alcasabas AA, Bachant JB, Elledge SJ (1998) Recovery from DNA replicational stress is the essential function of the S-phase checkpoint pathway. *Genes Dev* **12**: 2956-2970
- Desdouets C, Santocanale C, Drury LS, Perkins G, Foiani M, Plevani P, Diffley JFX (1998) Evidence for a Cdc6p-independent mitotic resetting event involving DNA polymerase α . *EMBO J* **17**: 4139-4146
- Diffley JF (2011) Quality control in the initiation of eukaryotic DNA replication. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **366**: 3545-3553
- Diffley JF, Bousset K, Labib K, Noton EA, Santocanale C, Tercero JA (2000) Coping with and recovering from hydroxyurea-induced replication fork arrest in budding yeast. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **65**: 333-342
- Diffley JFX, Cocker JH, Dowell SJ, Rowley A (1994) Two steps in the assembly of complexes at yeast replication origins *in vivo*. *Cell* **78**: 303-316
- Doe CL, Ahn JS, Dixon J, Whitby MC (2002) Mus81-Eme1 and Rqh1 involvement in processing stalled and collapsed replication forks. *J Biol Chem* **277**: 32753-32759
- Doe CL, Osman F, Dixon J, Whitby MC (2004) DNA repair by a Rad22-Mus81-dependent pathway that is independent of Rhp51. *Nucleic Acids Res* **32**: 5570-5581
- Doe CL, Whitby MC (2004) The involvement of Srs2 in post-replication repair and homologous recombination in fission yeast. *Nucleic Acids Res* **32**: 1480-1491
- Donovan S, Harwood J, Drury LS, Diffley JFX (1997) Cdc6-Dependent Loading of Mcm Proteins onto Pre-replicative Chromatin in Budding Yeast. *Proc Natl Acad Sci USA* **94**: 5611-5616

- Drury LS, Perkins G, Diffley JFX (1997) The Cdc4/34/53 pathway targets Cdc6p for proteolysis in budding yeast. *EMBO J* **16**: 5966-5976
- Drury LS, Perkins G, Diffley JFX (2000) The Cyclin Dependent Kinase Cdc28p Regulates Distinct Modes of Cdc6p Proteolysis during the Budding Yeast Cell Cycle. *Curr Biol* **10**: 231-240
- Durocher D, Henckel J, Fersht AR, Jackson SP (1999) The FHA domain is a modular phosphopeptide recognition motif. *Mol Cell* **4**: 387-394
- Durocher D, Taylor IA, Sarbassova D, Haire LF, Westcott SL, Jackson SP, Smerdon SJ, Yaffe MB (2000) The molecular basis of FHA domain:phosphopeptide binding specificity and implications for phospho-dependent signaling mechanisms. *Mol Cell* **6**: 1169-1182
- Ehmsen KT, Heyer WD (2008) *Saccharomyces cerevisiae* Mus81-Mms4 is a catalytic, DNA structure-selective endonuclease. *Nucleic Acids Res* **36**: 2182-2195
- Fabre F, Chan A, Heyer WD, Gangloff S (2002) Alternate pathways involving Sgs1/Top3, Mus81/Mms4, and Srs2 prevent formation of toxic recombination intermediates from single-stranded gaps created by DNA replication. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 16887-16892
- Fekairi S, Scaglione S, Chahwan C, Taylor ER, Tissier A, Coulon S, Dong MQ, Ruse C, Yates JR, 3rd, Russell P, Fuchs RP, McGowan CH, Gaillard PH (2009) Human SLX4 is a Holliday junction resolvase subunit that binds multiple DNA repair/recombination endonucleases. *Cell* **138**: 78-89
- Ferguson LR, Baguley BC (1996) Mutagenicity of anticancer drugs that inhibit topoisomerase enzymes. *Mutat Res* **355**: 91-101
- Ferguson LR, Pearson AE (1996) The clinical use of mutagenic anticancer drugs. *Mutat Res* **355**: 1-12
- Fien K, Hurwitz J (2006) Fission yeast Mcm10p contains primase activity. *J Biol Chem* **281**: 22248-22260
- Foiani M, Marini F, Gamba D, Lucchini G, Plevani P (1994) The B subunit of the DNA polymerase alpha-primase complex in *Saccharomyces cerevisiae* executes an essential function at the initial stage of DNA replication. *Mol Cell Biol* **14**: 923-933
- Forsburg SL (2004) Eukaryotic MCM proteins: beyond replication initiation. *Microbiol Mol Biol Rev* **68**: 109-131
- Franchitto A, Pirzio LM, Prosperi E, Sapora O, Bignami M, Pichierri P (2008) Replication fork stalling in WRN-deficient cells is overcome by prompt activation of a MUS81-dependent pathway. *J Cell Biol* **183**: 241-252
- Frankenberg-Schwager M (1990) Induction, repair and biological relevance of radiation-induced DNA lesions in eukaryotic cells. *Radiat Environ Biophys* **29**: 273-292
- Franklin WA, Doetsch PW, Haseltine WA (1985) Structural determination of the ultraviolet light-induced thymine-cytosine pyrimidine-pyrimidone (6-4) photoproduct. *Nucleic Acids Res* **13**: 5317-5325
- Fricke WM, Bastin-Shanower SA, Brill SJ (2005) Substrate specificity of the *Saccharomyces cerevisiae* Mus81-Mms4 endonuclease. *DNA Repair (Amst)* **4**: 243-251
- Friedberg EC (2005) Suffering in silence: the tolerance of DNA damage. *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**: 943-953
- Friedberg EC, Lehmann AR, Fuchs RP (2005) Trading places: how do DNA polymerases switch during translesion DNA synthesis? *Mol Cell* **18**: 499-505
- Friedel AM, Pike BL, Gasser SM (2009) ATR/Mec1: coordinating fork stability and repair. *Curr Opin Cell Biol*

- Friedl AA, Kiechle M, Fellerhoff B, Eckardt-Schupp F (1998) Radiation-induced chromosome aberrations in *Saccharomyces cerevisiae*: influence of DNA repair pathways. *Genetics* **148**: 975-988
- Friedman KL, Brewer BJ (1995) Analysis of replication intermediates by two-dimensional agarose gel electrophoresis. *Methods Enzymol* **262**: 613-627
- Fry RC, Begley TJ, Samson LD (2005) Genome-wide responses to DNA-damaging agents. *Annu Rev Microbiol* **59**: 357-377
- Fu Y, Xiao W (2003) Functional domains required for the *Saccharomyces cerevisiae* Mus81-Mms4 endonuclease complex formation and nuclear localization. *DNA Repair (Amst)* **2**: 1435-1447
- Gaillard PH, Noguchi E, Shanahan P, Russell P (2003) The endogenous Mus81-Eme1 complex resolves Holliday junctions by a nick and counternick mechanism. *Mol Cell* **12**: 747-759
- Gallo-Fernandez M, Saugar I, Ortiz-Bazan MA, Vazquez MV, Tercero JA (2012) Cell cycle-dependent regulation of the nuclease activity of Mus81-Eme1/Mms4. *Nucleic Acids Res* **40**: 8325-8335.
- Gambus A, Jones RC, Sanchez-Diaz A, Kanemaki M, van Deursen F, Edmondson RD, Labib K (2006) GINS maintains association of Cdc45 with MCM in replisome progression complexes at eukaryotic DNA replication forks. *Nat Cell Biol* **8**: 358-366
- Gaskell LJ, Osman F, Gilbert RJ, Whitby MC (2007) Mus81 cleavage of Holliday junctions: a failsafe for processing meiotic recombination intermediates? *EMBO J* **26**: 1891-1901
- Gietz D, St. Jean A, Woods RA, Schiestl RH (1992) Improved method for high efficiency transformation of intact yeast cells. *Nucleic Acids Res* **20**: 1425
- Gomes XV, Burgers PM (2001) ATP utilization by yeast replication factor C. I. ATP-mediated interaction with DNA and with proliferating cell nuclear antigen. *J Biol Chem* **276**: 34768-34775
- Guengerich FP (2000) Metabolism of chemical carcinogens. *Carcinogenesis* **21**: 345-351
- Guillet M, Boiteux S (2002) Endogenous DNA abasic sites cause cell death in the absence of Apn1, Apn2 and Rad1/Rad10 in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J* **21**: 2833-2841
- Güldener U, Heck S, Fiedler T, Beinhauer J, Hegemann JH (1996) A new efficient gene disruption cassette for repeated use in budding yeast. *Nucleic Acids Res* **24**: 2519-2524
- Hanada K, Budzowska M, Davies SL, van Drunen E, Onizawa H, Beverloo HB, Maas A, Essers J, Hickson ID, Kanaar R (2007) The structure-specific endonuclease Mus81 contributes to replication restart by generating double-strand DNA breaks. *Nat Struct Mol Biol* **14**: 1096-1104
- Hanahan D (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* **166**: 557-580
- Hefferin ML, Tomkinson AE (2005) Mechanism of DNA double-strand break repair by non-homologous end joining. *DNA Repair (Amst)* **4**: 639-648
- Hennessy KM, Clark CD, Botstein D (1990) Subcellular localization of yeast CDC46 varies with the cell cycle. *Genes Dev* **4**: 2252-2263
- Heyer WD, Ehmsen KT, Liu J (2010) Regulation of homologous recombination in eukaryotes. *Annu Rev Genet* **44**: 113-139
- Ho CK, Mazon G, Lam AF, Symington LS (2010) Mus81 and Yen1 promote reciprocal exchange during mitotic recombination to maintain genome integrity in budding yeast. *Mol Cell* **40**: 988-1000
- Hoeghe C, Pfander B, Moldovan GL, Pyrowolakis G, Jentsch S (2002) RAD6-dependent DNA repair is linked to modification of PCNA by ubiquitin and SUMO. *Nature* **419**: 135-141

- Hollingsworth NM, Brill SJ (2004) The Mus81 solution to resolution: generating meiotic crossovers without Holliday junctions. *Genes Dev* **18**: 117-125
- Husain I, Griffith J, Sancar A (1988) Thymine dimers bend DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**: 2558-2562
- Hutchinson F (1985) Chemical changes induced in DNA by ionizing radiation. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* **32**: 115-154
- Ii M, Brill SJ (2005) Roles of SGS1, MUS81, and RAD51 in the repair of lagging-strand replication defects in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Genet* **48**: 213-225
- Interthal H, Heyer WD (2000) MUS81 encodes a novel helix-hairpin-helix protein involved in the response to UV- and methylation-induced DNA damage in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Gen Genet* **263**: 812-827
- Ip SC, Rass U, Blanco MG, Flynn HR, Skehel JM, West SC (2008) Identification of Holliday junction resolvases from humans and yeast. *Nature* **456**: 357-361
- Ira G, Malkova A, Liberi G, Foiani M, Haber JE (2003) Srs2 and Sgs1-Top3 suppress crossovers during double-strand break repair in yeast. *Cell* **115**: 401-411
- Ira G, Pelliccioli A, Balijja A, Wang X, Fiorani S, Carotenuto W, Liberi G, Bressan D, Wan L, Hollingsworth NM, Haber JE, Foiani M (2004) DNA end resection, homologous recombination and DNA damage checkpoint activation require CDK1. *Nature* **431**: 1011-1017
- Jacobs A, Bopp A, Hagen U (1972) In vitro repair of single-strand breaks in -irradiated DNA by polynucleotide ligase. *Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med* **22**: 431-435
- Janke C, Magiera MM, Rathfelder N, Taxis C, Reber S, Maekawa H, Moreno-Borchart A, Doenges G, Schwob E, Schiebel E, Knop M (2004) A versatile toolbox for PCR-based tagging of yeast genes: new fluorescent proteins, more markers and promoter substitution cassettes. *Yeast* **21**: 947-962
- Jiricny J (2006) The multifaceted mismatch-repair system. *Nat Rev Mol Cell Biol* **7**: 335-346
- Johnson RE, Torres-Ramos CA, Izumi T, Mitra S, Prakash S, Prakash L (1998) Identification of APN2, the *Saccharomyces cerevisiae* homolog of the major human AP endonuclease HAP1, and its role in the repair of abasic sites. *Genes Dev* **12**: 3137-3143
- Kai M, Boddy MN, Russell P, Wang TS (2005) Replication checkpoint kinase Cds1 regulates Mus81 to preserve genome integrity during replication stress. *Genes Dev* **19**: 919-932
- Kai M, Furuya K, Paderi F, Carr AM, Wang TS (2007) Rad3-dependent phosphorylation of the checkpoint clamp regulates repair-pathway choice. *Nat Cell Biol* **9**: 691-697
- Kaliraman V, Mullen JR, Fricke WM, Bastin-Shanower SA, Brill SJ (2001) Functional overlap between Sgs1-Top3 and the Mms4-Mus81 endonuclease. *Genes Dev* **15**: 2730-2740
- Kamimura Y, Tak YS, Sugino A, Araki H (2001) Sld3, which interacts with Cdc45 (Sld4), functions for chromosomal DNA replication in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J* **20**: 2097-2107.
- Karras GI, Jentsch S (2010) The RAD6 DNA damage tolerance pathway operates uncoupled from the replication fork and is functional beyond S phase. *Cell* **141**: 255-267
- Kass EM, Jasin M (2010) Collaboration and competition between DNA double-strand break repair pathways. *FEBS Lett* **584**: 3703-3708

- Katou Y, Kanoh Y, Bando M, Noguchi H, Tanaka H, Ashikari T, Sugimoto K, Shirahige K (2003) S-phase checkpoint proteins Tof1 and Mrc1 form a stable replication-pausing complex. *Nature* **424**: 1078-1083
- Kim Y, Kipreos ET (2007) Cdt1 degradation to prevent DNA re-replication: conserved and non-conserved pathways. *Cell Div* **2**: 18
- Klemm RD, Austin RJ, Bell SP (1997) Coordinate Binding of ATP and Origin DNA Regulates the ATPase Activity of the Origin Recognition Complex. *Cell* **88**: 493-502
- Kolodner RD, Putnam CD, Myung K (2002) Maintenance of genome stability in *Saccharomyces cerevisiae*. *Science* **297**: 552-557
- Krishna TSR, Kong XP, Gary S, Burgers PM, Kuriyan J (1994) Crystal-structure of the eukaryotic DNA-polymerase processivity factor PCNA. *Cell* **79**: 1233-1243
- Krogh BO, Symington LS (2004) Recombination proteins in yeast. *Annu Rev Genet* **38**: 233-271
- Krokan HE, Standal R, Slupphaug G (1997) DNA glycosylases in the base excision repair of DNA. *Biochem J* **325 (Pt 1)**: 1-16
- Kunkel TA, Bebenek K (2000) DNA replication fidelity. *Annu Rev Biochem* **69**: 497-529
- Kunkel TA, Erie DA (2005) DNA mismatch repair. *Annu Rev Biochem* **74**: 681-710
- Labib K, Diffley JFX, Kearsley SE (1999) G1-phase and B-type cyclins exclude the DNA-replication factor Mcm4 from the nucleus. *Nat Cell Biol* **1**: 415-422
- Labib K, Kearsley SE, Diffley JFX (2001) MCM2-7 proteins are essential components of prereplicative complexes, that accumulate co-operatively in the nucleus during G1-phase, and are required to establish, but not maintain, the S-phase checkpoint. *Mol Biol Cell* **12**: 3658-3667
- Labib K, Tercero JA, Diffley JF (2000) Uninterrupted MCM2-7 function required for DNA replication fork progression. *Science* **288**: 1643-1647
- Lambert S, Froget B, Carr AM (2007) Arrested replication fork processing: interplay between checkpoints and recombination. *DNA Repair (Amst)* **6**: 1042-1061
- Larson K, Sahm J, Shenkar R, Strauss B (1985) Methylation-induced blocks to in vitro DNA replication. *Mutat Res* **150**: 77-84
- Lawley PD, Phillips DH (1996) DNA adducts from chemotherapeutic agents. *Mutat Res* **355**: 13-40
- Lei M, Kawasaki Y, Young MR, Kihara M, Sugino A, Tye BK (1997) Mcm2 is a target of regulation by Cdc7-Dbf4 during the initiation of DNA synthesis. *Genes Dev* **11**: 3365-3374
- Lengronne A, Pasero P, Bensimon A, Schwob E (2001) Monitoring S phase progression globally and locally using BrdU incorporation in TK(+) yeast strains. *Nucleic Acids Res* **29**: 1433-1442
- Li X, Heyer WD (2008) Homologous recombination in DNA repair and DNA damage tolerance. *Cell Res* **18**: 99-113
- Liang C, Weinreich M, Stillman B (1995) ORC and Cdc6p interact and determine the frequency of initiation of DNA replication in the genome. *Cell* **81**: 667-676
- Lindahl T (1993) Instability and decay of the primary structure of DNA. *Nature* **362**: 709-715
- Lindahl T (2001) Keynote: past, present, and future aspects of base excision repair. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* **68**: xvii-xxx

- Lisby M, Rothstein R, Mortensen UH (2001) Rad52 forms DNA repair and recombination centers during S phase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 8276-8282
- Longtine MS, McKenzie A, 3rd, Demarini DJ, Shah NG, Wach A, Brachet A, Philippsen P, Pringle JR (1998) Additional modules for versatile and economical PCR-based gene deletion and modification in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **14**: 953-961.
- Lopes M, Cotta-Ramusino C, Pelliccioli A, Liberi G, Plevani P, Muzi-Falconi M, Newlon C, Foiani M (2001) The DNA replication checkpoint response stabilizes stalled replication forks. *Nature* **412**: 557-561
- Lopes M, Foiani M, Sogo JM (2006) Multiple mechanisms control chromosome integrity after replication fork uncoupling and restart at irreparable UV lesions. *Mol Cell* **21**: 15-27
- Lopez-Mosqueda J, Maas NL, Jonsson ZO, Defazio-Eli LG, Wohlschlegel J, Toczyski DP (2010) Damage-induced phosphorylation of Sld3 is important to block late origin firing. *Nature* **467**: 479-483
- Lorenz A, West SC, Whitby MC (2010) The human Holliday junction resolvase GEN1 rescues the meiotic phenotype of a *Schizosaccharomyces pombe* mus81 mutant. *Nucleic Acids Res* **38**: 1866-1873
- Lucas I, Germe T, Chevrier-Miller M, Hyrien O (2001) Topoisomerase II can unlink replicating DNA by precatenane removal. *EMBO J* **20**: 6509-6519.
- Lucca C, Vanoli F, Cotta-Ramusino C, Pelliccioli A, Liberi G, Haber J, Foiani M (2004) Checkpoint-mediated control of replisome-fork association and signalling in response to replication pausing. *Oncogene* **23**: 1206-1213
- Lundin C, North M, Erixon K, Walters K, Jenssen D, Goldman AS, Helleday T (2005) Methyl methanesulfonate (MMS) produces heat-labile DNA damage but no detectable in vivo DNA double-strand breaks. *Nucleic Acids Res* **33**: 3799-3811
- Lupardus PJ, Byun T, Yee MC, Hekmat-Nejad M, Cimprich KA (2002) A requirement for replication in activation of the ATR-dependent DNA damage checkpoint. *Genes Dev* **16**: 2327-2332
- Lydall D (2003) Hiding at the ends of yeast chromosomes: telomeres, nucleases and checkpoint pathways. *J Cell Sci* **116**: 4057-4065
- Ma W, Resnick MA, Gordenin DA (2008) Apn1 and Apn2 endonucleases prevent accumulation of repair-associated DNA breaks in budding yeast as revealed by direct chromosomal analysis. *Nucleic Acids Res* **36**: 1836-1846
- Maiorano D, Moreau J, Mechali M (2000) XCDT1 is required for the assembly of pre-replicative complexes in *Xenopus laevis*. *Nature* **404**: 622-625
- Majka J, Burgers PM (2004) The PCNA-RFC families of DNA clamps and clamp loaders. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* **78**: 227-260
- Malkova A, Ivanov EL, Haber JE (1996) Double-strand break repair in the absence of RAD51 in yeast: a possible role for break-induced DNA replication. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**: 7131-7136
- Masai H, Matsumoto S, You Z, Yoshizawa-Sugata N, Oda M (2010) Eukaryotic chromosome DNA replication: where, when, and how? *Annu Rev Biochem* **79**: 89-130
- Masai H, Taniyama C, Ogino K, Matsui E, Kakusho N, Matsumoto S, Kim JM, Ishii A, Tanaka T, Kobayashi T, Tamai K, Ohtani K, Arai K (2006) Phosphorylation of MCM4 by Cdc7 kinase facilitates its interaction with Cdc45 on the chromatin. *J Biol Chem* **281**: 39249-39261
- McCarroll RM, Fangman WL (1988) Time of replication of yeast centromeres and telomeres. *Cell* **54**: 505-513

- McElhinny SA, Gordenin DA, Stith CM, Burgers PM, Kunkel TA (2008) Division of labor at the eukaryotic replication fork. *Mol Cell* **30**: 137-144
- McPherson JP, Lemmers B, Chahwan R, Pamidi A, Migon E, Matysiak-Zablocki E, Moynahan ME, Essers J, Hanada K, Poonepalli A, Sanchez-Sweatman O, Khokha R, Kanaar R, Jasin M, Hande MP, Hakem R (2004) Involvement of mammalian Mus81 in genome integrity and tumor suppression. *Science* **304**: 1822-1826
- Meister P, Taddei A, Vernis L, Poidevin M, Gasser SM, Baldacci G (2005) Temporal separation of replication and recombination requires the intra-S checkpoint. *J Cell Biol* **168**: 537-544
- Melo JA, Cohen J, Toczyski DP (2001) Two checkpoint complexes are independently recruited to sites of DNA damage in vivo. *Genes Dev* **15**: 2809-2821
- Merchant AM, Kawasaki Y, Chen Y, Lei M, Tye BK (1997) A lesion in the DNA replication initiation factor Mcm10 induces pausing of elongation forks through chromosomal replication origins in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **17**: 3261-3271
- Merrick CJ, Jackson D, Diffley JF (2004) Visualization of altered replication dynamics after DNA damage in human cells. *J Biol Chem* **279**: 20067-20075
- Micklem G, Rowley A, Harwood J, Nasmyth K, Diffley JFX (1993) Yeast origin recognition complex is involved in DNA replication and transcriptional silencing. *Nature* **366**: 87-89
- Moldovan GL, Pfander B, Jentsch S (2007) PCNA, the maestro of the replication fork. *Cell* **129**: 665-679
- Morrison AJ, Kim JA, Person MD, Highland J, Xiao J, Wehr TS, Hensley S, Bao Y, Shen J, Collins SR, Weissman JS, Delrow J, Krogan NJ, Haber JE, Shen X (2007) Mec1/Tel1 phosphorylation of the INO80 chromatin remodeling complex influences DNA damage checkpoint responses. *Cell* **130**: 499-511
- Mortensen UH, Bendixen C, Sunjevaric I, Rothstein R (1996) DNA strand annealing is promoted by the yeast Rad52 protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**: 10729-10734
- Motegi A, Kuntz K, Majeed A, Smith S, Myung K (2006) Regulation of gross chromosomal rearrangements by ubiquitin and SUMO ligases in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **26**: 1424-1433
- Moyer SE, Lewis PW, Botchan MR (2006) Isolation of the Cdc45/Mcm2-7/GINS (CMG) complex, a candidate for the eukaryotic DNA replication fork helicase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 10236-10241
- Mullen JR, Kaliraman V, Ibrahim SS, Brill SJ (2001) Requirement for three novel protein complexes in the absence of the Sgs1 DNA helicase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **157**: 103-118
- Mullen JR, Nallaseth FS, Lan YQ, Slagle CE, Brill SJ (2005) Yeast Rmi1/Nce4 controls genome stability as a subunit of the Sgs1-Top3 complex. *Mol Cell Biol* **25**: 4476-4487
- Muñoz-Galván S, Tous C, Blanco MG, Schwartz EK, Ehmsen KT, West SC, Heyer WD, Aguilera A (2012) Distinct roles of Mus81, Yen1, Slx1-Slx4, and Rad1 nucleases in the repair of replication-born double-strand breaks by sister chromatid exchange. *Mol Cell Biol* **32**: 1592-1603
- Myung K, Datta A, Kolodner RD (2001) Suppression of spontaneous chromosomal rearrangements by S phase checkpoint functions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell* **104**: 397-408
- Newman M, Murray-Rust J, Lally J, Rudolf J, Fadden A, Knowles PP, White MF, McDonald NQ (2005) Structure of an XPF endonuclease with and without DNA suggests a model for substrate recognition. *EMBO J* **24**: 895-905
- Nguyen VQ, Co C, Irie K, Li JJ (2000) Clb/Cdc28 kinases promote nuclear export of the replication initiator proteins Mcm2-7. *Curr Biol* **10**: 195-205

- Nguyen VQ, Co C, Li JJ (2001) Cyclin-dependent kinases prevent DNA re-replication through multiple mechanisms. *Nature* **411**: 1068-1073.
- Nishino T, Komori K, Ishino Y, Morikawa K (2005) Structural and functional analyses of an archaeal XPF/Rad1/Mus81 nuclease: asymmetric DNA binding and cleavage mechanisms. *Structure* **13**: 1183-1192
- Nishitani H, Lygerou Z, Nishimoto T, Nurse P (2000) The Cdt1 protein is required to license DNA for replication in fission yeast. *Nature* **404**: 625-628
- Novak JE, Ross-Macdonald PB, Roeder GS (2001) The budding yeast Msh4 protein functions in chromosome synapsis and the regulation of crossover distribution. *Genetics* **158**: 1013-1025
- Osman F, Dixon J, Doe CL, Whitby MC (2003) Generating crossovers by resolution of nicked Holliday junctions: a role for Mus81-Eme1 in meiosis. *Mol Cell* **12**: 761-774
- Osman F, Whitby MC (2007) Exploring the roles of Mus81-Eme1/Mms4 at perturbed replication forks. *DNA Repair (Amst)* **6**: 1004-1017
- Pacek M, Tutter AV, Kubota Y, Takisawa H, Walter JC (2006) Localization of MCM2-7, Cdc45, and GINS to the site of DNA unwinding during eukaryotic DNA replication. *Mol Cell* **21**: 581-587
- Papamichos-Chronakis M, Peterson CL (2008) The Ino80 chromatin-remodeling enzyme regulates replisome function and stability. *Nat Struct Mol Biol* **15**: 338-345
- Paques F, Haber JE (1999) Multiple pathways of recombination induced by double-strand breaks in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Mol Biol Rev* **63**: 349-404
- Pardo B, Gomez-Gonzalez B, Aguilera A (2009) DNA repair in mammalian cells: DNA double-strand break repair: how to fix a broken relationship. *Cell Mol Life Sci* **66**: 1039-1056
- Paulovich AG, Armour CD, Hartwell LH (1998) The *Saccharomyces cerevisiae* RAD9, RAD17, RAD24 and MEC3 genes are required for tolerating irreparable, ultraviolet-induced DNA damage. *Genetics* **150**: 75-93
- Paulovich AG, Hartwell LH (1995) A checkpoint regulates the rate of progression through S phase in *S. cerevisiae* in response to DNA damage. *Cell* **82**: 841-847
- Pearlman DA, Holbrook SR, Pirkle DH, Kim SH (1985) Molecular models for DNA damaged by photoreaction. *Science* **227**: 1304-1308
- Pelliccioli A, Lucca C, Liberi G, Marini F, Lopes M, Plevani P, Romano A, Di Fiore PP, Foiani M (1999) Activation of Rad53 kinase in response to DNA damage and its effect in modulating phosphorylation of the lagging strand DNA polymerase. *EMBO J* **18**: 6561-6572
- Pfander B, Moldovan GL, Sacher M, Hoegge C, Jentsch S (2005) SUMO-modified PCNA recruits Srs2 to prevent recombination during S phase. *Nature* **436**: 428-433
- Popoff SC, Spira AI, Johnson AW, Demple B (1990) Yeast structural gene (APN1) for the major apurinic endonuclease: homology to *Escherichia coli* endonuclease IV. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**: 4193-4197
- Povirk LF (1996) DNA damage and mutagenesis by radiomimetic DNA-cleaving agents: bleomycin, neocarzinostatin and other enediynes. *Mutat Res* **355**: 71-89
- Putnam CD, Jaehnig EJ, Kolodner RD (2009) Perspectives on the DNA damage and replication checkpoint responses in *Saccharomyces cerevisiae*. *DNA Repair (Amst)* **8**: 974-982
- Raghuraman MK, Brewer BJ, Fangman WL (1997) Cell cycle-dependent establishment of a late replication program. *Science* **276**: 806-809

- Raghuraman MK, Winzeler EA, Collingwood D, Hunt S, Wodicka L, Conway A, Lockhart DJ, Davis RW, Brewer BJ, Fangman WL (2001) Replication dynamics of the yeast genome. *Science* **294**: 115-121
- Randell JC, Bowers JL, Rodriguez HK, Bell SP (2006) Sequential ATP hydrolysis by Cdc6 and ORC directs loading of the Mcm2-7 helicase. *Mol Cell* **21**: 29-39
- Rass U, Compton SA, Matos J, Singleton MR, Ip SC, Blanco MG, Griffith JD, West SC (2010) Mechanism of Holliday junction resolution by the human GEN1 protein. *Genes Dev* **24**: 1559-1569
- Raveendranathan M, Chattopadhyay S, Bolon YT, Haworth J, Clarke DJ, Bielinsky AK (2006) Genome-wide replication profiles of S-phase checkpoint mutants reveal fragile sites in yeast. *EMBO J* **25**: 3627-3639
- Reichard P (1988) Interactions between deoxyribonucleotide and DNA synthesis. *Annu Rev Biochem* **57**: 349-374
- Remus D, Diffley JF (2009) Eukaryotic DNA replication control: lock and load, then fire. *Curr Opin Cell Biol* **21**: 771-777
- Ricke RM, Bielinsky AK (2004) Mcm10 regulates the stability and chromatin association of DNA polymerase-alpha. *Mol Cell* **16**: 173-185
- Rose MD, Winston F, Hieter P (1989) *Methods in Yeast Genetics*, Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Rupert CS (1975) Enzymatic photoreactivation: overview. *Basic Life Sci* **5A**: 73-87
- Sanchez Y, Desany BA, Jones WJ, Liu Q, Wang B, Elledge SJ (1996) Regulation of RAD53 by the ATM-like kinases MEC1 and TEL1 in yeast cell cycle checkpoint pathways. *Science* **271**: 357-360
- Santocanale C, Diffley JFX (1996) ORC- and Cdc6-dependent complexes at active and inactive chromosomal replication origins in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J* **15**: 6671-6679
- Santocanale C, Diffley JFX (1998) A Mec1- and Rad53-dependent checkpoint controls late-firing origins of DNA replication. *Nature* **395**: 615-618
- Santocanale C, Sharma K, Diffley JFX (1999) Activation of dormant origins of DNA replication in budding yeast. *Genes Dev* **13**: 2360-2364
- Sassanfar M, Samson L (1990) Identification and preliminary characterization of an O6-methylguanine DNA repair methyltransferase in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **265**: 20-25
- Schendel PF, Robins PE (1978) Repair of O6-methylguanine in adapted *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **75**: 6017-6020
- Schepers A, Diffley JFX (2001) Mutational analysis of conserved sequence motifs in the budding yeast Cdc6 protein. *J Mol Biol* **308**: 597-608.
- Schiestl RH, Gietz RD (1989) High efficiency transformation of intact yeast cells using single stranded nucleic acids as a carrier. *Curr Genet* **16**: 339-346
- Schleker T, Shimada K, Sack R, Pike BL, Gasser SM (2010) Cell cycle-dependent phosphorylation of Rad53 kinase by Cdc5 and Cdc28 modulates checkpoint adaptation. *Cell Cycle* **9**: 350-363
- Schwartz DC, Cantor CR (1984) Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis. *Cell* **37**: 67-75
- Schwartz EK, Heyer WD (2011) Processing of joint molecule intermediates by structure-selective endonucleases during homologous recombination in eukaryotes. *Chromosoma* **120**: 109-127

- Sclafani RA, Holzen TM (2007) Cell cycle regulation of DNA replication. *Annu Rev Genet* **41**: 237-280
- Sedgwick B, Bates PA, Paik J, Jacobs SC, Lindahl T (2007) Repair of alkylated DNA: recent advances. *DNA Repair (Amst)* **6**: 429-442
- Segurado M, Diffley JF (2008) Separate roles for the DNA damage checkpoint protein kinases in stabilizing DNA replication forks. *Genes Dev* **22**: 1816-1827
- Segurado M, Tercero JA (2009) The S-phase checkpoint: targeting the replication fork. *Biol Cell* **101**: 617-627
- Setlow RB (1966) Cyclobutane-type pyrimidine dimers in polynucleotides. *Science* **153**: 379-386
- Sheu YJ, Stillman B (2006) Cdc7-Dbf4 phosphorylates MCM proteins via a docking site-mediated mechanism to promote S phase progression. *Mol Cell* **24**: 101-113
- Shimada K, Oma Y, Schleker T, Kugou K, Ohta K, Harata M, Gasser SM (2008) Ino80 chromatin remodeling complex promotes recovery of stalled replication forks. *Curr Biol* **18**: 566-575
- Shirahige K, Hori Y, Shiraishi K, Yamashita M, Takahashi K, Obuse C, Tsurimoto T, Yoshikawa H (1998) Regulation of DNA-replication origins during cell-cycle progression. *Nature* **395**: 618-621
- Shrivastav N, Li D, Essigmann JM (2010) Chemical biology of mutagenesis and DNA repair: cellular responses to DNA alkylation. *Carcinogenesis* **31**: 59-70
- Signon L, Malkova A, Naylor ML, Klein H, Haber JE (2001) Genetic requirements for RAD51- and RAD54-independent break-induced replication repair of a chromosomal double-strand break. *Mol Cell Biol* **21**: 2048-2056
- Sikorski RS, Hieter P (1989) A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **122**: 19-27
- Singer B (1975) The chemical effects of nucleic acid alkylation and their relation to mutagenesis and carcinogenesis. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* **15**: 219-284
- Singer B, Kusmierek JT (1982) Chemical mutagenesis. *Annu Rev Biochem* **51**: 655-693
- Sogo JM, Lopes M, Foiani M (2002) Fork reversal and ssDNA accumulation at stalled replication forks owing to checkpoint defects. *Science* **297**: 599-602
- Speck C, Chen Z, Li H, Stillman B (2005) ATPase-dependent cooperative binding of ORC and Cdc6 to origin DNA. *Nat Struct Mol Biol* **12**: 965-971
- Stern DF, Zheng P, Beidler DR, Zerillo C (1991) Spk1, a new kinase from *Saccharomyces cerevisiae*, phosphorylates proteins on serine, threonine, and tyrosine. *Mol Cell Biol* **11**: 987-1001
- Stokes MP, Van Hatten R, Lindsay HD, Michael WM (2002) DNA replication is required for the checkpoint response to damaged DNA in *Xenopus* egg extracts. *J Cell Biol* **158**: 863-872
- Sun Z, Fay DS, Marini F, Foiani M, Stern DF (1996) Spk1/Rad53 is regulated by Mec1-dependent protein phosphorylation in DNA replication and damage checkpoint pathways. *Genes Dev* **10**: 395-406
- Sung P, Klein H (2006) Mechanism of homologous recombination: mediators and helicases take on regulatory functions. *Nat Rev Mol Cell Biol* **7**: 739-750
- Svendsen JM, Smogorzewska A, Sowa ME, O'Connell BC, Gygi SP, Elledge SJ, Harper JW (2009) Mammalian BTBD12/SLX4 assembles a Holliday junction resolvase and is required for DNA repair. *Cell* **138**: 63-77

- Symington LS (2002) Role of RAD52 epistasis group genes in homologous recombination and double-strand break repair. *Microbiol Mol Biol Rev* **66**: 630-670, table of contents
- Szostak JW, Orr-Weaver TL, Rothstein RJ, Stahl FW (1983) The double-strand-break repair model for recombination. *Cell* **33**: 25-35
- Szyjka SJ, Aparicio JG, Viggiani CJ, Knott S, Xu W, Tavare S, Aparicio OM (2008) Rad53 regulates replication fork restart after DNA damage in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev* **22**: 1906-1920
- Tanaka S, Diffley JF (2002) Interdependent nuclear accumulation of budding yeast Cdt1 and Mcm2--7 during G1 phase. *Nat Cell Biol* **4**: 198-207.
- Tanaka S, Umemori T, Hirai K, Muramatsu S, Kamimura Y, Araki H (2007) CDK-dependent phosphorylation of Sld2 and Sld3 initiates DNA replication in budding yeast. *Nature* **445**: 328-332
- Tay YD, Wu L (2010) Overlapping roles for Yen1 and Mus81 in cellular Holliday junction processing. *J Biol Chem* **285**: 11427-11432
- Taylor ER, McGowan CH (2008) Cleavage mechanism of human Mus81-Eme1 acting on Holliday-junction structures. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**: 3757-3762
- Tercero JA (2009) Density transfer as a method to analyze the progression of DNA replication forks. *Methods Mol Biol* **521**: 203-213
- Tercero JA, Diffley JF (2001) Regulation of DNA replication fork progression through damaged DNA by the Mec1/Rad53 checkpoint. *Nature* **412**: 553-557
- Tercero JA, Labib K, Diffley JF (2000) DNA synthesis at individual replication forks requires the essential initiation factor Cdc45p. *EMBO J* **19**: 2082-2093
- Tercero JA, Longhese MP, Diffley JF (2003) A central role for DNA replication forks in checkpoint activation and response. *Mol Cell* **11**: 1323-1336
- Thaminy S, Newcomb B, Kim J, Gatbonton T, Foss E, Simon J, Bedalov A (2007) Hst3 is regulated by Mec1-dependent proteolysis and controls the S phase checkpoint and sister chromatid cohesion by deacetylating histone H3 at lysine 56. *J Biol Chem* **282**: 37805-37814
- Thomas BT, Rothstein R (1989) Elevated recombination rates in transcriptionally active DNA. *Cell* **56**: 619-630
- Trowbridge K, McKim K, Brill SJ, Sekelsky J (2007) Synthetic lethality of *Drosophila* in the absence of the MUS81 endonuclease and the DmBlm helicase is associated with elevated apoptosis. *Genetics* **176**: 1993-2001
- Unk I, Hajdú I, Blastyák A, Haracska L (2010) Role of yeast Rad5 and its human orthologs, HLTF and SHPRH in DNA damage tolerance. *DNA Repair (Amst)* **9**: 257-267
- Viscardi V, Clerici M, Cartagena-Lirola H, Longhese MP (2005) Telomeres and DNA damage checkpoints. *Biochimie* **87**: 613-624
- Waga S, Stillman B (1994) Anatomy of a DNA replication fork revealed by reconstitution of SV40 DNA replication in vitro. *Nature* **369**: 207-212
- Wang SY (1965) Photochemical reactions of nucleic acid components in frozen solutions. *Fed Proc* **24**: 71
- Ward JF (1990) The yield of DNA double-strand breaks produced intracellularly by ionizing radiation: a review. *Int J Radiat Biol* **57**: 1141-1150

- Wechsler T, Newman S, West SC (2011) Aberrant chromosome morphology in human cells defective for Holliday junction resolution. *Nature* **471**: 642-646
- Wei YF, Carter KC, Wang RP, Shell BK (1996) Molecular cloning and functional analysis of a human cDNA encoding an *Escherichia coli* AlkB homolog, a protein involved in DNA alkylation damage repair. *Nucleic Acids Res* **24**: 931-937
- Weinert TA, Kiser GL, Hartwell LH (1994) Mitotic checkpoint genes in budding yeast and the dependence of mitosis on DNA-replication and repair. *Genes Dev* **8**: 652-665
- West SC (2009) The search for a human Holliday junction resolvase. *Biochem Soc Trans* **37**: 519-526
- Whitby MC, Osman F, Dixon J (2003) Cleavage of model replication forks by fission yeast Mus81-Eme1 and budding yeast Mus81-Mms4. *J Biol Chem* **278**: 6928-6935
- Wilmes GM, Archambault V, Austin RJ, Jacobson MD, Bell SP, Cross FR (2004) Interaction of the S-phase cyclin Clb5 with an "RXL" docking sequence in the initiator protein Orc6 provides an origin-localized replication control switch. *Genes Dev* **18**: 981-991
- Wohlschlegel JA, Dwyer BT, Dhar SK, Cvetic C, Walter JC, Dutta A (2000) Inhibition of eukaryotic DNA replication by geminin binding to Cdt1. *Science* **290**: 2309-2312.
- Wu F, Shirahata A, Sakuraba K, Kitamura Y, Goto T, Saito M, Ishibashi K, Kigawa G, Nemoto H, Sanada Y, Hibi K (2010) Downregulation of Mus81 as a novel prognostic biomarker for patients with colorectal carcinoma. *Cancer Sci* **102**: 472-477
- Wu JR, Gilbert DM (1996) A distinct G1 step required to specify the Chinese hamster DHFR replication origin. *Science* **271**: 1270-1272
- Wu L, Hickson ID (2003) The Bloom's syndrome helicase suppresses crossing over during homologous recombination. *Nature* **426**: 870-874
- Xiao W, Chow BL, Hanna M, Doetsch PW (2001) Deletion of the MAG1 DNA glycosylase gene suppresses alkylation-induced killing and mutagenesis in yeast cells lacking AP endonucleases. *Mutat Res* **487**: 137-147
- Yabuuchi H, Yamada Y, Uchida T, Sunathvanichkul T, Nakagawa T, Masukata H (2006) Ordered assembly of Sld3, GINS and Cdc45 is distinctly regulated by DDK and CDK for activation of replication origins. *EMBO J* **25**: 4663-4674
- You Z, Kong L, Newport J (2002) The role of single-stranded DNA and polymerase alpha in establishing the ATR, Hus1 DNA replication checkpoint. *J Biol Chem* **277**: 27088-27093
- Zegerman P, Diffley JF (2007) Phosphorylation of Sld2 and Sld3 by cyclin-dependent kinases promotes DNA replication in budding yeast. *Nature* **445**: 281-285
- Zegerman P, Diffley JF (2010) Checkpoint-dependent inhibition of DNA replication initiation by Sld3 and Dbf4 phosphorylation. *Nature* **467**: 474-478
- Zhao X, Muller EG, Rothstein R (1998) A suppressor of two essential checkpoint genes identifies a novel protein that negatively affects dNTP pools. *Mol Cell* **2**: 329-340
- Zhou BB, Elledge SJ (2000) The DNA damage response: putting checkpoints in perspective. *Nature* **408**: 433-439
- Zhu W, Ukomadu C, Jha S, Senga T, Dhar SK, Wohlschlegel JA, Nutt LK, Kornbluth S, Dutta A (2007) Mcm10 and And-1/CTF4 recruit DNA polymerase alpha to chromatin for initiation of DNA replication. *Genes Dev* **21**: 2288-2299

Zou L, Elledge SJ (2003) Sensing DNA damage through ATRIP recognition of RPA-ssDNA complexes. *Science* **300**: 1542-1548

Zou L, Liu D, Elledge SJ (2003) Replication protein A-mediated recruitment and activation of Rad17 complexes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 13827-13832